

Institut für Veterinärbakteriologie
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Max M. Wittenbrink

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Prof. Dr. med. vet. Ludwig E. Hölzle

**Wirksamkeit antimikrobieller Wirkstoffe bei
Corynebacterium pseudotuberculosis:
Etablierung und Anwendung einer Empfindlichkeitstestung
mittels Bouillonmikrodilution und Agardiffusion**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Stephanie Schulthess

Tierärztin
von Killwangen, Aargau

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Ludwig E. Hölzle, Referent

Prof. Dr. Ulrich Bleul, Korreferent

Zürich 2013

Danksagung

Meinem lieben Ehemann, für seine unendliche Geduld

Meinen Eltern für jegliche Unterstützung

C.Z. für seine tragende Rolle

Prof. Wittenbrink für das Überlassen des Themas

Herr Prof. Hölzle und Frau Dr. Hölzle für die gute Betreuung

Inhaltsverzeichnis

Abstract	2
Zusammenfassung	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	5
2 Literaturübersicht	6
2.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	6
2.2 <i>Virulenzfaktoren von Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	7
2.3 <i>Pseudotuberkulose bei kleinen Wiederkäuern</i>	10
2.4 <i>Pseudotuberkulose als Zoonose</i>	14
2.5 <i>Resistenzlage</i>	14
2.6 <i>Methoden zur Antibiotika-Empfindlichkeitstestung in vitro</i>	15
2.7 <i>Arbeitskonzept</i>	17
3 Material und Methoden	18
3.1 <i>Bakterienstämme und Isolate</i>	18
3.2 <i>Inokulum für die Antibiotika Resistenz-Tests</i>	24
3.3 <i>Antibiotika Resistenz-Test</i>	26
4 Ergebnisse	35
4.1 <i>Charakterisierung der C. pseudotuberculosis Isolate</i>	35
4.2 <i>Adaptierung der Antibiotika-Empfindlichkeitstestung für C. pseudotuberculosis</i>	38
4.2.1 <i>Herstellung des Inokulums</i>	38
4.2.2 <i>Auswahl des Mediums</i>	40
4.2.3 <i>Optimierung der Inkubationsbedingungen</i>	40
4.2.4 <i>Festlegung von Grenzwerten („break points“) für die MHK-Testung</i>	41
4.3 <i>Ergebnisse der getesteten Stämme</i>	41
5 Diskussion	52
6 Literaturverzeichnis	56
7 Sonstige Literatur-Quellen	64

Stephanie Schulthess

Institut für Veterinärbakteriologie der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

ivb@vetbakt.uzh.ch

Antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: establishment and application of susceptibility testing using agar diffusion and microdilution methods.

Corynebacterium pseudotuberculosis (*Cp*) is the causative agent of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep and goats; CLA is worldwide distributed and causes significant economic damage to the animal husbandry. In the last few years the increase in antibiotic resistance continues to gain significance. In order to make evaluable assertions about the situation of antibiotic resistance in *Cp* reliable testing methods are needed. In this study well established methods i.e. agar diffusion test and microdilution test were modified and adapted to the special growth characteristics of *Cp*. The newly adapted methods now allow for resistance testing of *Cp* isolates during routine diagnostics. Sonication and dispersing of the inoculum, incubation in a wet chamber, as well as adding sheep or horse blood were used to facilitate the evaluation of the tests.

Using the newly adapted methods a total of 62 *Cp* isolates derived from the routine diagnostic laboratory of the IVB Zurich were tested for antibiotic susceptibility patterns. The obtained results were compared with published data. The resistance situation for *Cp* in Switzerland was found to be unproblematic. The newly adapted methods have proven to be suitable for routine diagnostics.

Key words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agar diffusion, microdilution, sheep, goat

Stephanie Schulthess

Institut für Veterinärbakteriologie der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

ivb@vetbakt.uzh.ch

Wirksamkeit antimikrobieller Wirkstoffe bei *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Etablierung und Anwendung einer Empfindlichkeitstestung mittels Bouillonmikrodilution und Agardiffusion

Corynebacterium pseudotuberculosis (Cp) ist der Erreger der Pseudotuberkulose von Schaf und Ziege, die weltweit grosse Verluste in der Tierhaltung verursacht. Die Problematik von Antibiotika-Resistenzen hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Um Aussagen über die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen bei Cp machen zu können, sind verlässliche *in vitro*-Testmethoden notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden etablierte Testverfahren wie Bouillondilution und Agardiffusion speziellen Wachstumscharakteristika von Cp angepasst. Eine spezielle Behandlung des Inokulums im Ultraschallbad und ein Dispersionszusatz ermöglichten ein homogenes Gemisch für den Probenansatz. Die Zugabe von Schaf- bzw. Pferdeblut in die Kultivierungsmedien und eine aerobe Bebrütung in einer feuchten Kammer ermöglichten die Auswertung der Tests.

62 Stämme von Cp aus der Probensammlung des IVB Zürich wurden mittels der neu adaptierten Methoden auf ihre Antibiotika-Empfindlichkeit getestet und mit Literaturwerten verglichen. Dabei zeigte sich eine günstige Resistenzlage für Cp in der Schweiz. Die adaptierten Testmethoden haben sich als gut geeignet für die Routinediagnostik erwiesen.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Bouillonmikrodilution, Agardiffusion, Schaf, Ziege

Abkürzungsverzeichnis

<i>Cp</i>	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
CSLI	Clinical Laboratory and Standards Institute
i.e.	id est
iU	Internationale Einheiten
IVB	Institut für Veterinärbakteriologie
KBE	Koloniebildende Einheit
kbp	Kilobasenpaare
MBEC	Minimum biofilm eradication concentration
MHK	Minimale Hemmstoff-Konzentration
MHz	Mega Hertz
ml	Milliliter
p	pico
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PLD	Phospholipase D
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
sog.	so genannt
μ	Mikro

1 Einleitung

Die Anwendung antibakteriell wirksamer Arzneimittel (Antibiotika) ist eine der wichtigsten Massnahmen zur Bekämpfung/Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin. Durch das vermehrte Auftreten und die Verbreitung von Resistenzen wird ein wirkungsvoller Einsatz von Antibiotika bei Tier und Mensch bei einer Vielzahl von bakteriellen Erregern zunehmend eingeschränkt. Aktuell wird insbesondere die Zunahme von resistenten Staphylokokken (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, MRSA) und resistenten Enterobakterien (sog. Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Keimen) in verschiedenen Tierarten, der Umwelt, im Futter, in Lebensmitteln und beim Menschen beobachtet und intensiv diskutiert.

Um Antibiotika gezielt und sinnvoll einzusetzen und somit der Entwicklung von Resistenzen entgegen wirken zu können, sollte deren Wirksamkeit gegen das zu behandelnde Bakterium nachgewiesen werden. Der Nachweis der Wirksamkeit erfolgt im Labor mittels Empfindlichkeitstestung (Antibiogramme). Zwei Labormethoden werden im veterinärmedizinischen Bereich meist angewendet: einerseits der Agardiffusionstest (Auflegen Antibiotika-beladener Blättchen auf ein mit dem zu testenden Keim beimpftes Agarmedium) und andererseits die Messung sog. minimaler Hemmstoffkonzentrationen (MHK-Werte) mittels Mikrobouillon-Dilution. Für viele Bakterien wurden solche Testmethoden bereits etabliert und international standardisiert (internationale Standards, CLSI), so dass Ergebnisse unterschiedlicher Labore miteinander verglichen werden können. Für viele andere Keime, insbesondere tiermedizinisch-relevante Krankheitserreger, müssen solche Testsysteme noch etabliert und standardisiert werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung von Methoden zur Empfindlichkeitstestung von *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Cp*), dem Erreger der Pseudotuberkulose beim kleinen Wiederkäuer. *Cp* ist ein gram-positives, pleomorphes, fakultativ intrazellulär wachsendes Stäbchenbakterium. Die kulturellen Eigenschaften von *Cp*, wie relativ langsames Wachstum, Aneinanderhaften während der Vermehrung und dadurch Bildung von dichten, klumpigen Kolonien, erschweren in der Routinediagnostik die Überprüfung der Wirksamkeit von Antibiotika gegen *Cp*. Im Rahmen dieser Arbeit wurden etablierte Tests, i.e. Agardiffusionstest und Mikrobouillon-Dilution modifiziert und an die speziellen Anforderungen von *Cp* angepasst, um eine Anwendung in der Routine-Diagnostik zu ermöglichen. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden *Cp*-Isolate aus der Routinediagnostik des Institutes für Veterinärbakteriologie, Universität Zürich, der letzten Jahre untersucht, um eine Aussage über die Resistenzsituation bei *Cp* in der Schweiz zu treffen.

2 Literaturübersicht

2.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Corynebacterium pseudotuberculosis (Cp) ist ein grampositives, fakultativ intrazelluläres Bakterium mit pleomorphem Erscheinungsbild (kokkoid, keulenförmig, filamentöse Stäbchen). Die Grösse variiert zwischen 0.5 bis 0.6 x 1.0 bis 3.0 µm (Quinn et al., 1999; Connor et al., 2000; Dorella et al., 2006). Es ist unbeweglich, fakultativ anaerob, fermentativ, Katalase-positiv und bildet keine Sporen (Quinn et al., 1999). Auf Schafblutagar bildet Cp nach 24 bis 48 h kleine, trockene, weisse, aneinander haftende Kolonien, welche sich schlecht suspendieren lassen. In flüssigem Medium zeigt sich das Wachstum von Cp in Form von granulärem Sediment (Muckle und Gyles, 1982). Unter dem Mikroskop findet man Cp häufig paarweise. Die Paare sind häufig V- oder palisadenförmig angeordnet (Clarridge und Spiegel, 1995).

Taxonomisch gehört Cp zur Ordnung der *Actinomycetales* (Aktinomyzeten), einer sehr heterogenen Gruppe von Bakterien, die spezielle gemeinsame Eigenschaften aufweisen wie (1) eine charakteristische Organisation der Zellwand, bestehend aus einem Arabinogalactan-Peptidoglycan-Polymer und kovalent gebundenen langkettigen Mykolsäuren (Collins et al., 1982; Bayan et al., 2003; Dorella et al., 2006) und (2) ein hoher Guanin und Cytosin (G+C) Anteil der DNA (47 bis 74%) (Goodfellow, 1989; Dorella et al., 2006). Weitere veterinärmedizinisch wichtige Vertreter der Aktinomyzeten sind Vertreter der Genera *Mycobacterium* (i.e. *Mycobacterium bovis*, *M. avium* subspecies *paratuberculosis*) *Actinomyces* (*Actinomyces bovis*), *Arcanobacterium* (*Arcanobacterium pyogenes*) sowie *Rhodococcus* (*Rhodococcus equi*; Dorella et al., 2006).

Es existieren zwei Biovare von Cp. Biovar equi zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, Nitrat zu reduzieren (Nitratreduktase positiv), Biovar ovis hingegen ist Nitratreduktase negativ (Biberstein et al., 1971). Diese Einteilung in zwei Biovare wurde durch Restriktionsenzymanalysen von genomischer Cp-DNA und Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus der 16S rDNA bestätigt (Songer et al., 1988; Costa et al., 1998; Sutherland et al., 1996). Biovar equi tritt vermehrt bei Pferd und Rind, Biovar ovis bei Schaf und Ziege auf, wobei auch Infektionen der jeweils anderen Tierarten vorkommen können (Dorella et al., 2006).

Inzwischen wurde das Genom verschiedener Cp-Stämme sequenziert, u.a. Stämme die aus Schaf, Ziege, Pferd, Lama und Mensch isoliert wurden (Ruiz et al., 2011; Pethick et al., 2012; Lopes et al., 2012; Cerdeira et al., 2011; Trost et al. 2010). Dabei zeigte sich, dass das zirkuläre, doppelsträngige Genom von Cp mit einer Grösse von ca. 2.3 Mbp zu den kleinsten Genomen im Genus *Corynebacterium* gehört, und dass der Guanidin-Cytosin-Gehalt der

2.2 Virulenzfaktoren von *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Zellwandaufbau

[illegible]

7

Phospholipase D (PLD)

Als wichtigster Virulenzfaktor bei *Cp* wurde die Phospholipase D (PLD), ein sehr potentes Exotoxin, identifiziert (Hodgson et al., 1999; Dorella et al., 2006). PLD ist ein Enzym, dass Sphingomyelin in Ceramidphosphat und Cholin spaltet (Abbildung 2). Sphingomyeline sind integrale Bestandteile von Biomembranen. Durch ihre Spaltung werden Blut- und Lymphgefäße durchlässiger. Dadurch kann *Cp* sich lokal von der Eintrittspforte in die regionalen Lymphknoten ausbreiten (Peel et al., 1997; Carne und Onon, 1978; McNamara et al., 1995). Ausserdem verursacht PLD dermonekrotische Läsionen und ist in höheren Dosen letal für eine Vielzahl von Labortieren (Dorella et al., 2006). *In vitro* konnte eine Schädigung und Zerstörung von caprinen Makrophagen durch PLD nachgewiesen werden (Tashjian und Campbell, 1983).

PLD scheint essentiell für die primäre Infektion und die Bildung von chronischen Abszessen zu sein, denn eine Mutante von *Cp*, die kein PLD produziert, konnte keine Infektion hervorrufen. Welche genaue Rolle PLD in der Abszessbildung spielt, ist aber weiterhin unbekannt (Songer, 1997). PLD scheint charakteristisch für *Cp* zu sein und wurde mit Ausnahme von *C. ulcerans* bei keinem anderen *Corynebacterium* gefunden (Barksdale et al., 1981).

Der Nachweis der PLD Produktion lässt sich mit einem Hämolyse-Test erbringen (von manchen Autoren auch „CAMP“-Test genannt in Anlehnung an den CAMP-Test bei Staphylokokken; Baird und Fontaine, 2007). Dabei wird der synergistische hämolytische Effekt von *Cp*-PLD und dem sogenannten Equi-Faktor von *Rhodococcus equi* bei Co-Kultur der beiden Bakterien nachgewiesen. Durch die enzymatische Aktivität von PLD entsteht aus der Spaltung von Sphingomyelin Ceramidphosphat, das nachfolgend durch die Phospholipase C (Equi-Faktor) von *R. equi* hydrolysiert wird. Bei Co-Kultur der beiden Bakterien kommt es in den Kontaktbereichen der Impfstriche zur Ausbildung einer deutlichen Hämolyse (Abbildung 3; Fraser, 1961; Bernheimer et al., 1980; Barksdale et al., 1981; Songer, 1997).

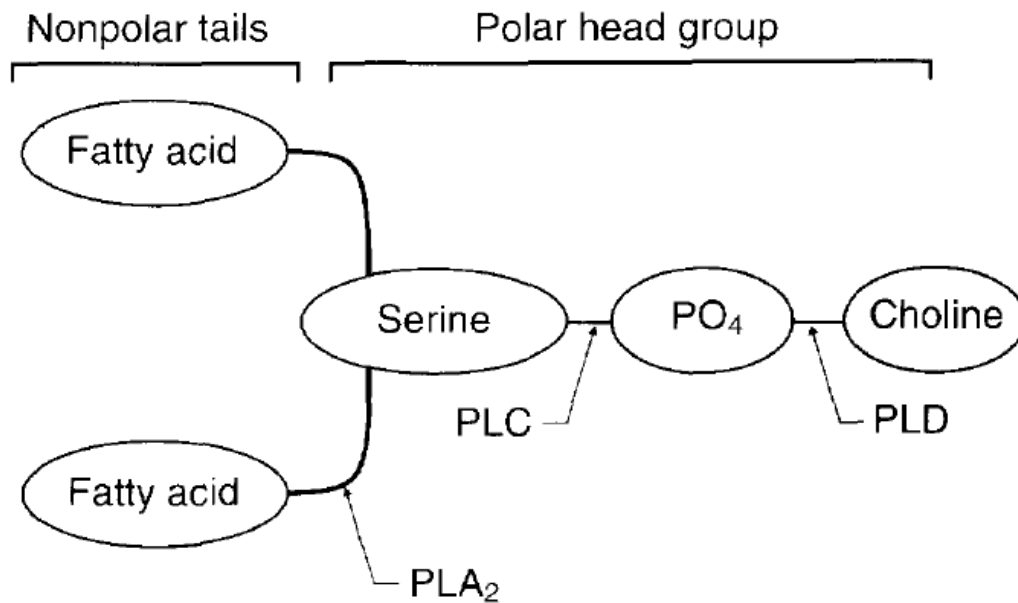


Abbildung 2: Ansatzstellen der Phospholipase A₂(PLA₂), Phospholipase C (PLC) und Phospholipase D (PLD; Songer, 1997)

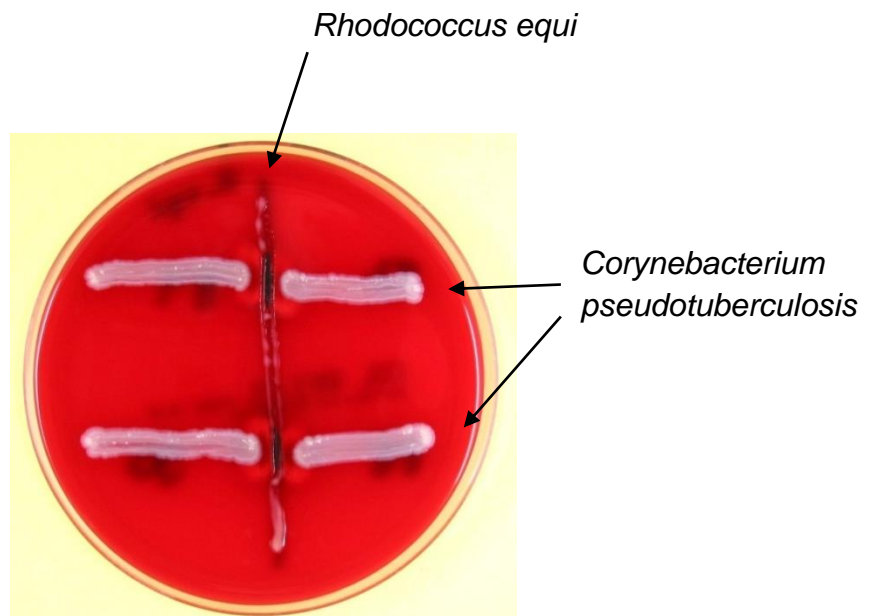


Abbildung 3: Synergistische Hämolyse von *Corynebacterium pseudotuberculosis* und *Rhodococcus equi*.

2.3 Pseudotuberkulose der kleinen Wiederkäuer

Cp verursacht bei Schaf und Ziege eine verkäsende Lymphadenitis und beim Pferd eine ulzerative Lymphangitis (Foley et al., 2004). Sporadisch treten auch Infektionen bei anderen Spezies auf. So verursacht *Cp* u.a. bei Neuweltkameliden eine eitrige Lymphadenopathie (Braga et al., 2006), bei Rindern Mastitiden (Stapleton et al., 2009), bei Büffeln Lymphknotenabszesse (Anderson et al., 2004) und bei arabischen Springböcken Abszesse (Tarello und Theneyan, 2008). Daneben sind in der Literatur bisher 32 humane Infektionen beschrieben (Hémond et al., 2009). Die meisten humanen Erkrankungen wurden nach engem Kontakt mit Schafen und Ziegen beschrieben. Beim Menschen entsteht in der Regel eine chronische, lokal begrenzte, eitrig-granulomatöse Lymphadenitis meist der Axillar-, Inguinal- oder Cervicallymphknoten (Mills et al., 1997; Baird und Fontaine, 2007).

Beim kleinen Wiederkäuer verläuft die Krankheit chronisch und zunächst klinisch unauffällig. Es kommt zur Ausbildung von eitrig-verkäsenden Granulomen in den Lymphknoten. Die Veränderungen treten in zwei Formen, der externen und der viszeralen auf (Baird und Fontaine, 2007). Die externe Form ist gekennzeichnet durch Vergrößerung der oberflächlichen Lymphknoten mit Abszessbildung (Abbildung 4). Im Falle einer Fistulierung wird gelb-grüner Eiter abgegeben. Alle Lymphknoten können betroffen sein in Abhängigkeit von der Eintrittspforte des Erregers (Baird und Fontaine, 2007). Bei der viszeralen Form sind Lymphknoten der inneren Organe betroffen wie z.B. Lymphknoten der Lunge und des Mediastinums. Bei stark vergrößerten Lymphknoten kann es zur Einschränkung der Organfunktionen und damit zum Auftreten von klinischen Symptomen, wie Atembeschwerden kommen. Abszessbildung findet man auch in der Leber, den Nieren und seltener auch im Herz, Hoden, Skrotum, Uterus, Gehirn oder in Gelenken (Baird und Fontaine, 2007). Pathologisch-anatomisch sieht man typische weisse, zwiebelschalenartig aufgebaute Abszesse (Abbildung 5) in den betroffenen submaxillaren, präskapulären, inguinalen, supramammären oder viszeralen Lymphknoten (Lloyd, 1994). Chronisch infizierte Tiere magern oft ab und verlieren an Leistungsfähigkeit.

Bei der klinischen Ausprägung der Pseudotuberkulose sind Unterschiede zwischen Schaf und Ziege beschrieben. Beim Schaf dominiert die viszerale Form insbesondere unter Beteiligung der Lunge (Renshaw et al., 1979; Hein und Cargill, 1981). Bei der Ziege dagegen findet man am häufigsten Abszesse der oberflächlichen Lymphknoten am Kopf und Hals (Burrell, 1981; Batey, 1986; Brown und Olander, 1987).

Diagnose

Die Diagnose bei der äusseren Form wird aufgrund des klinischen Bildes (vergrösserte Lymphknoten) sowie dem mikroskopischen und kulturellen Erregernachweis aus Abszessmaterial gestellt. Bei der viszeralen Form dagegen wird die Diagnose häufig aufgrund der pathologisch-anatomischen Befundung in Kombination mit dem mikroskopischen und kulturellen Erregernachweis gestellt. Mikroskopisch sieht man grampositive, keulenförmige Bakterien, die nach Kultivierung auf Schafblutagar kleine weisse Kolonien bilden (Baird und Fontaine, 2007). Weitere diagnostische Massnahmen beinhalten eine biochemische Differenzierung mittels kommerziell erhältlicher Testsysteme und den PLD-Nachweis mittels „CAMP“-Test (synergistische vollständige Hämolyse auf Schafblutagar durch *Cp* und *Rhodococcus equi*; Baird und Fontaine, 2007). Serodiagnostische Methoden wie ELISA oder Western Blot zum Nachweis einer humoralen Immunantwort sind das Mittel der Wahl sowohl für die Identifizierung von klinisch inapparenten Einzeltieren als auch für die Implementierung von Eradikationsprogrammen. Als Antigene wurden bisher entweder *Cp*-Ganzzellpräparationen (Kaba et al., 2001), PLD aus Kulturüberständen (Ter Laak et al., 1992; Seyffert et al., 2010) oder rekombinant hergestelltes PLD (Menzies et al., 2004) verwendet. Solche Testsysteme sind aber für die Routine bislang nicht etabliert, da alle bisherigen Testsysteme keine ausreichende Sensitivität und/oder Spezifität aufwiesen (Menzies et al., 2004; Binns et al., 2007). Zum Nachweis der humoralen Immunantwort wurde ausserdem ein „Surface Plasmon Resonance“-Test (SPR-Test) beschrieben, der in Zukunft möglicherweise die Sensitivität und Spezifität serologischer Testsysteme deutlich verbessern kann (Stapleton et al., 2009).

Da es sich bei *Cp* um ein fakultativ intrazelluläres Bakterium handelt, stellt der Nachweis der zellulären Immunantwort eine wichtige diagnostische Möglichkeit dar. Dabei haben sich Interferon-Gamma Tests mit Kulturüberstand-Präparationen (sekretiertes *Cp*-Antigen) oder rekombinanten PLD als Antigen, als geeignet erwiesen (Reboucas et al., 2011). Vorteile dieser Methode sind eine relativ hohe Spezifität und Sensitivität, der Nachteil dieser Methode liegt insbesondere darin, dass der Arbeitsaufwand hoch und der Probendurchsatz dadurch deutlich geringer als beim ELISA ist.

Epidemiologie

Häufigster Weg der Einschleppung der Pseudotuberkulose in eine *Cp*-Herde ist der Zukauf klinisch-inapparent infizierter Tiere. Innerhalb der Herde erfolgt die Ausbreitung durch die *Cp*-Ausscheidung aus aufbrechenden Abszessen. Man geht davon aus, dass Abszessmaterial ca. 10^6 bis 10^7 viable Bakterien pro Gramm enthält (Brown und Olander, 1987). Weiterhin wurde eine Erregerausscheidung über die Milch, den Kot, und

Lungensekret beschrieben (Baird und Fontaine, 2007). *Cp* können in der Umwelt sehr lange persistieren und stellen somit eine permanente Infektionsquelle für andere Tiere der Herde dar (Moura-Costa et al., 2008). Klassische Eintrittspforten für *Cp* sind Wunden, die durch die jährliche oder halbjährliche Schur der Schafe entstehen oder durch scharfe Kanten an Umzäunungen, Melkständen oder Dornengebüschen. Andere Wege der Übertragung können peroral sein, oder bei Lämmern auch omphalogen (Lloyd, 1994). Eine aerogene Infektion sowie die Erregerübertragung durch den Vektor *Musca domestica* (Stubenfliege) sind möglich (Braverman et al., 1999).

Eine epidemiologisch wichtige Besonderheit der Schweiz ist die Alpsömmerung von Ziegen und Schafen, da dabei häufig verschiedene Tierbestände vermischt werden und sich Infektionen weiter verbreiten können. Als zusätzliches Problem hat sich die Nähe zur natürlichen Population der Alpsteinböcke (*Capra ibex ibex*) und der Gämse (*Rupicapra rupicapra*) während der Sömmerung gezeigt (Ryser-Degiorgis et al., 2002). Diese Wildtiere könnten als Reservoir für *Cp* auftreten, Infektionen bei Steinbock und Gämse wurden nachgewiesen (Hämmerli et al., 1999).



Abbildung 4: Schwellung eines Ohrlymphknotens bei einer Ziege

(<http://www.landwirtschaftskammer.de/landwirtschaft/tiergesundheit/hgd/pseudotuberkulose.htm>)

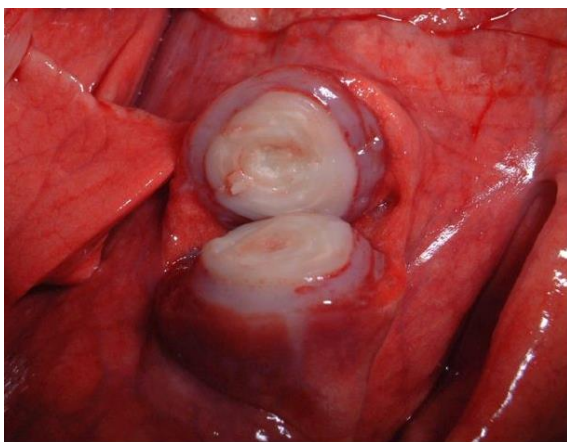


Abbildung 5: Abszess aufgrund einer *Cp*-Infektion

Therapie

Als therapeutische Massnahmen wurden (1) Abszess-Spaltung mit anschliessender lokaler Behandlung mit Jod-haltigen Lösungen, (2) Applikation von Formalin in den Abszess, (3) operative Entfernung von Abszessen oder (4) parenterale Applikation eines Antibiotikums beschrieben (Williamson, 2001; Washburn et al., 2009). Problematisch bei der Spaltung von Abszessen ist die Freisetzung grosser Bakterienmengen und somit die mögliche Weiterverbreitung im Bestand zu sehen (Moura-Costa et al., 2008). Rein antibiotische Therapien sind häufig nicht effektiv genug, da aufgrund der dicken Kapsel bei *Cp*-induzierten Abszessen keine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration erreicht wird und ausserdem Antibiotika verwendet werden müssen, die eine ausreichend hohe intrazelluläre Konzentration erreichen (Piontkowski and Shivers, 1998). Als wirksame Alternative wird eine geschlossene Abszess-Lavage mit physiologischer Kochsalz-Lösung in Kombination mit lokaler und systemischer Antibiotika-Therapie erachtet (Washburn et al., 2009).

Bekämpfungsprogramme

In der Schweiz ist die Pseudotuberkulose beim kleinen Wiederkäuer eine zu überwachende Seuche nach TSV Art. 291. Damit müssen alle auftretenden Fälle dem zuständigen Kantonstierarzt gemeldet werden.

Für die Schweiz wurde durch den Beratungs- und Gesundheitsdienst für Kleinwiederkäuer (BGK), Sektion Ziegen, ein freiwilliges Pseudotuberkulose-Überwachungsprogramm durchgeführt. Das Ziel des Programms war, klinisch Pseudotuberkulose-freie Herden aufzubauen, um so die Ausbreitung der Pseudotuberkulose in und zwischen Herden zu verhindern. Im Rahmen dieses Programms unterzogen Tierhalter ihre Herden freiwillig jährlichen Kontrollen. Daraus ergab sich entweder der Status „klinisch Pseudotuberkulose-frei“ oder „klinisch nicht Pseudotuberkulose-frei“. Bei nicht freien Herden wurden verschiedene Möglichkeiten der Sanierung empfohlen. Diese beinhalteten das Separieren erkrankter Tiere bis hin zur Volsanierung mit mutterloser Aufzucht der Zicklein (BGK – Technische Weisung). Aktuell wird nun über den BGK ein freiwilliges Pseudotuberkulose-Sanierungsprogramm für Ziegen angeboten (<http://bgk.caprovis.ch>) (BGK – Pseudotuberkulose- Sanierungsprogramm für Ziegen). Dieses Programm soll die Sanierung von mit Pseudotuberkulose befallenen Betrieben ermöglichen. Die Tiere werden aufgrund eines positiven serologischen *Cp*-Status entweder gemerzt oder separiert. Betriebe, in denen alle Tiere ein negatives serologisches Resultat aufweisen, erhalten den Status „serologisch Pseudotuberkulose-frei“. Ziel ist der Aufbau von serologisch *Cp*-freien Herden.

In den Niederlanden gibt es auch ein Bekämpfungsprogramm, welches ebenfalls auf freiwilliger Basis in einer Ziegenzüchter-Vereinigung läuft. Wie im Schweizer Projekt wird

nicht nur ein „klinisch Pseudotuberkulose-freier“-Status angestrebt sondern ein „absolut Pseudotuberkulose-freier Status“. In Herden in denen Pseudotuberkulose auftritt, werden die erkrankten Tiere entfernt, die Zicklein mutterlos aufgezogen, die Einstreu vollständig entfernt und die Stallungen desinfiziert. Die verbleibenden Ziegen werden alle sechs Monate mit einem Doppel-Antikörper Sandwich ELISA serologisch überprüft (Ter Laak et al., 1992). Wenn alle Ziegen in zwei aufeinander folgenden Kontrollen negative Titer aufweisen gilt die Herde als Pseudotuberkulose frei (Dercksen et al., 1996).

2.4 Pseudotuberkulose als Zoonose

Humane Erkrankungen sind selten und wurden fast immer nach engem Kontakt mit Schafen und Ziegen beschrieben. Es sind also in der Regel Personen betroffen, die regelmässigen Kontakt zu Schafen und Ziegen haben, wie z.B. Farmer, Schlachter, Schafscherer und Hirten. Beim Menschen entsteht in der Regel eine chronische, lokal begrenzte, eitrige-granulomatöse Lymphadenitis meist der Axilliar-, Inguinal- oder Cervicallymphknoten (Peel et al., 1997; Mils et al., 1997; Baird und Fontaine, 2007). Da die antibiotische Behandlung in der Regel zu keiner vollständigen Heilung führt, wird sie meistens in Kombination mit einer chirurgischen Behandlung des befallenen Lymphknotens durchgeführt.

2.5 Resistenzlage

Bisher durchgeführte Studien haben gezeigt, dass *Cp*-Isolate meist empfindlich sind für ein sehr breites Spektrum an antimikrobiell wirksamen Substanzen (Connor et al., 2000). Dennoch konnte gezeigt werden, dass das Empfindlichkeitsspektrum zwischen den Isolaten in Abhängigkeit von der Quelle variiert (Dorella et al., 2006). In der Studie von Connor et al. (2000) waren fast alle *Cp*-Isolate aus Schaf, Ziege und Pferd resistent gegenüber Streptomycin. Hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber Neomycin, Kanamycin, Gentamicin, Sulfamethazol und Furazolidon konnten aber Unterschiede zwischen verschiedenen *Cp*-Isolaten beobachtet werden.

Um mögliche Unterschiede zwischen *Biovar ovis* und *equi* betreffend ihrer Resistenzeigenschaften zu untersuchen, wurden die Resistenzmuster von acht *Biovar ovis* Isolaten mit 29 *Biovar equi* Isolaten verglichen. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede mit Ausnahme von Amikacin (Costa et al., 1998). Bei einer Studie mit 54 *Cp*-Isolaten aus den USA, Kanada und Südafrika waren, obwohl die Proben den *Biovaren equi* und *ovis* zugeordnet werden konnten, keine signifikanten Empfindlichkeitsunterschiede für Streptomycin und Amikacin ersichtlich. Es zeigte sich aber, dass die meisten Isolate resistent gegenüber Aminoglycosiden, Nitrofuranen, Polymyxin, und Nalidixinsäure waren (Judson

und Songer, 1991). Resistenzen gegenüber Nalidixinsäure wurde auch schon von Pépin et al. (1989) beobachtet. Laut einer Studie aus Colorado, Kentucky, Utah, und Kalifornien bei Pferden waren alle getesteten isolierten *Cp*-Isolate empfänglich für das gesamte Spektrum an getesteten Wirkstoffen (Foley et al., 2004).

Untersuchungen zur „minimalen Hemmstoffkonzentration“ (MHK-Werte) ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Einige Arbeitsgruppen fanden ähnliche MHK-Werte bei verschiedenen *Cp*-Isolaten, andere Untersuchungen zeigten MHK-Unterschiede auf, insbesondere bei Testung von *Cp*-Isolaten aus dem Euter von an Mastitis erkrankten Schafen (Dorella et al., 2006; Costa et al., 1998; Fernandez et al., 2001).

Eine besondere Situation zeigte sich bei der Untersuchung der Antibiotika-Empfindlichkeit von *Cp*-Isolaten unter „Biofilm-Bedingungen“, um die Umgebung einer natürlichen Infektion zu simulieren. Olson et al. (2001) konnten zeigen, dass *Cp*-Isolate unter diesen Bedingungen resistent gegenüber einer Vielzahl von antimikrobiell wirksamen Substanzen waren.

2.6 Methoden zur Antibiotika-Empfindlichkeitstestung *in vitro*

Die Bestimmung von Antibiotika-Resistenzen von klinischen Bakterienisolaten ist eine der grundlegenden Aufgaben im mikrobiologischen Labor, um einerseits eine geeignete Therapie auszuwählen, aber auch, um Resistenzentwicklungen zu erfassen und beurteilen zu können. Um valide und vergleichbare Ergebnisse in allen mikrobiologischen Labors zu erhalten werden vom „Clinical Laboratory and Standard Institute“ (CLSI) Standards erarbeitet und ständig aktualisiert.

Für die Untersuchung der Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber antibiotischen Substanzen *in vitro* unterscheidet man prinzipiell zwei verschiedene Testverfahren: Reihenverdünnungsmethoden, wie die Bouillondilution und die Mikrobouillondilution zur Bestimmung der „minimalen Hemmstoffkonzentrationen“ (MHK-Werte) und die Agardiffusion. Daneben wurden Testverfahren wie der Epsilon-Test (E-Test) entwickelt, die eine Kombination aus Agardiffusion und Reihenverdünnungsmethode darstellen.

Bei der Agardiffusion werden Filterpapierplättchen, die mit einer definierten Antibiotika-Menge beladen sind, auf einen mit einer Bakteriensuspension beimpften Nährbodenagar mit definierter Dicke und standardisiertem pH- und Ionen-Gehalt aufgelegt wobei das Antibiotikum in den Agar diffundiert. Bei dem Agar handelt es sich nach CLSI-Vorgaben um einen Kationen-adjustierten Müller-Hinton-Agar, der bei anspruchsvollen Bakterien wie z.B. bei *Cp* mit 5% defibriniertem Blut supplementiert werden kann. Die Bakteriensuspension wird nach CLSI-Standard angefertigt, insbesondere die Bakteriendichte muss mittels McFarland-Standard oder photometrischer Messung der optischen Dichte (bei 625 nm) bestimmt

werden. Im Agar entsteht ein Wirkstoff-Konzentrationsgefälle. Nach Inkubation des Nährbodens entsteht je nach Empfindlichkeit des Bakteriums durch die Hemmung des Wachstums eine Zone mit sichtbarer Wachstumsinhibition (Hemmhof). Die Grösse des Hemmhofdurchmessers ist abhängig von der Empfindlichkeit des Bakteriums: resistente Bakterien weisen einen kleinen bis keinen Hemmhof, sensible Bakterien einen grossen Hemmhofdurchmesser auf. Aufgrund von definierten Referenzwerten für einzelne Antibiotika und Bakterien-Spezies kann somit eine Beurteilung in „empfindlich“, „intermediär“, oder „resistent“ gegenüber einzelnen Wirkstoffen vorgenommen werden (CLSI 2006 a). Vorteil der Agardiffusion ist die schnelle, einfache und kostengünstige Durchführung. Es werden mehrere Wirkstoffe gleichzeitig getestet und die Testanordnung kann den jeweiligen Bedürfnissen (i.e. Tierart, Bakterienspezies) angepasst werden. Nachteile der Methode sind eine relativ aufwändige Standardisierung und die rein qualitative Aussagekraft ohne Bestimmung der MHK.

Reihenverdünnungsmethoden ermöglichen eine direkte Aussage darüber, ab welcher Konzentration des Antibiotikums das getestete Bakterium nicht mehr fähig ist zu wachsen. Die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums bei der zu beobachten ist, dass bakterielles Wachstum sichtbar gehemmt wird, ist der sogenannte MHK-Wert (CLSI 2006 b).

Antibiotische Lösungen werden einer Reihenverdünnung unterzogen, so dass die Konzentration der Wirkstoffe, mit jeder Stufe halbiert wird. Zu den Antibiotika-Verdünnungen wird eine Bakteriensuspension in CLSI-standardisierter Müller-Hinton-Bouillon mit standardisierter Dichte (CLSI 2006 b) pipettiert. Beim Bouillontest werden Volumina von ca. 1 ml verwendet, beim Mikrobouillondilutionstest wird eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit kleinen Volumina verwendet. Der Mikrobouillondilutionstest hat den Vorteil, dass weniger Material gebraucht wird und pro Platte mehrere Antibiotika parallel getestet werden können. Daher findet in der Regel der Mikrobouillondilutionstest Anwendung in der Praxis. Vorteile der Reihenverdünnungsmethode sind seine bessere Standardisierbarkeit und die aussagekräftigeren quantitativen Daten zur Empfindlichkeit (MHK-Werte). Nachteile dieser Methode im Vergleich zur Agardiffusion sind die relativ hohen Kosten und die geringere Flexibilität hinsichtlich des Test-Layouts und der zu testenden Substanzen.

Hemmhofdurchmesser und MHK weisen eine indirekte Proportionalität auf. Bakterienisolate mit niedriger MHK weisen einen grossen Hemmhofdurchmesser bzw. Isolate mit hoher MHK einen kleinen Hemmhofdurchmesser auf. Bei der Untersuchung von verschiedenen *Cp*-Isolaten konnte zwischen Agardiffusion und Verdünnungsverfahren eine gute Übereinstimmung nachgewiesen werden, obwohl die Resultate der Agardiffusion für *Cp* aufgrund des relativ langsamen Wachstums schwierig zu interpretieren waren (Muckle und Gyles, 1982).

2.7 Arbeitskonzept

Ziel der Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Empfindlichkeitstestung von *Cp* Isolaten, die es ermöglicht, schnell und einfach die minimale Hemmstoffkonzentration von ausgewählten, für die Klinik relevanten, Antibiotika zu testen. Bedingt durch besondere Kultur-Eigenschaften von *Cp* waren bislang solche Testsysteme für die Routinediagnostik nicht etabliert. Als Grundlage für die Etablierung wurden Vorschriften und Normen des US-amerikanischen CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute) verwendet.

Die Ergebnisse des neu etablierten Tests zur Bestimmung der MHK wurden mit den Ergebnissen der Agardiffusion verglichen. Im zweiten Teil der Arbeit wurden *Cp* Isolate aus dem Diagnostikbetrieb des IVB Zürich aus den Jahren 1999 bis 2006 hinsichtlich ihrer Antibiotika-Empfindlichkeit getestet, um so eine Aussage über die Resistenzlage von *Cp* in der Schweiz zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme und Isolate

Die in dieser Arbeit verwendeten Cp Isolate stammen aus der Bakteriensammlung des Institutes für Veterinärbakteriologie Zürich. Es handelt sich dabei um Isolate aus der Routinediagnostik der Jahre 1999 bis 2006, die aus Schafen (n=21) und Ziegen (n=39) mit klinisch-manifester Pseudotuberkulose stammen.

Für die Qualitätskontrolle der Mikrobouillondilution wurden die vom CLSI empfohlenen Referenzstämme (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; DMSZ; Braunschweig, Deutschland) verwendet: *Escherichia coli* (ATCC-Nr. 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-Nr. 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC-Nr. 25923 und 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC-Nr. 29121) und *Streptococcus pneumoniae* (ATCC-Nr. 49619).

Kulturtechniken

Material

COLUMBIA-AGAR MIT SCHAFBLUT

REF: PB5008A

Oxoid AG

Durchführung

Die Referenzstämme und die Cp Isolate wurden mittels fraktioniertem Ausstrich auf Schafblutagar ausgestrichen und für 24 Stunden bei +37°C aerob (Referenzstämme) bzw. 5% CO₂-Athmosphäre (Cp-Isolate) inkubiert. Jedes Isolat wurde drei Mal subkultiviert, bevor es hinsichtlich seiner Antibiotika-Empfindlichkeit untersucht wurde.

Charakterisierung der Isolate

Gram-Färbung

Material

Kristallviolett-Oxalat Lösung (R1-F) Color Gram 2 zur Färbung von Mikroorganismen

REF: 55 545

bioMérieux (Suisse) SA

Stabilisierte Lugol-PVP Lösung (R2-F) Color Gram 2 zur Färbung von Mikroorganismen

REF: 55 546

bioMérieux (Suisse) SA

Safarin-Lösung (R4-F) Color Gram 2 zur Färbung von Mikroorganismen
REF: 55 548
bioMérieux (Suisse) SA

Durchführung

Die Gramfärbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Eine Kolonie wurde in einem Tropfen steriler 0.9%igen NaCl-Lösung auf einem Objektträger suspendiert, an der Luft getrocknet und mit Hitze fixiert.
2. Das Präparat wurde 3 Minuten mit Kristallviolett-Oxalat Lösung gefärbt.
3. Die Farblösung wurde abgegossen.
4. Das Präparat wurde 2 Minuten mit Lugolscher Lösung gefärbt (Farbkristallbildung).
5. Die Farblösung wurde abgegossen.
6. Das Präparat wurde mit 96%igem Alkohol entfärbt bis keine Farbe mehr abgegeben wurde.
7. Die Entfärbung wurde durch gründliches Spülen mit Leitungswasser gestoppt.
8. Es erfolgte eine kurze Gegenfärbung mit Safranin (15 Sek.).
9. Das Präparat wurde mit Leitungswasser abgespült und in einem Fließpapierblock getrocknet.

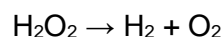
Katalase- Reaktion

Material

Wasserstoffperoxid 30%
Merck KGaA

Durchführung

Ein Tropfen Wasserstoffperoxid wurde auf einen Objektträger aufgebracht. Ein Teil einer Kolonie wurde mit einer sterilen Öse entnommen und mit dem Wasserstoffperoxid vermischt. Eine Gasbildung zeigt eine positive Katalase-Reaktion an. Das Gas entsteht, weil das Enzym Katalase folgende Reaktion katalysiert:



Erythrozyten enthalten ebenfalls Katalase, daher ist bei der Entnahme des Probenmaterials unbedingt darauf zu achten, dass kein Blutagar mit aufgenommen wird, da dieser ein falsch positives Ergebnis hervorrufen könnte.

Hämolyse-Test

Material

COLUMBIA-AGAR MIT SCHAFBLUT

REF: PB5008A

Oxoid AG

Durchführung

Die Produktion von Phospholipase D (PLD; Exotoxin von *Cp*), kann durch den Nachweis der synergistischen Wirkung von PLD und dem Equi-Faktor von *Rhodococcus equi* nachgewiesen werden (Abbildung 3). Auf einer Blutagarplatte wurden bis zu acht *Cp*-Isolate in horizontalen Linien ausgestrichen. Rechtwinklig dazu wurde in der Mitte der Platte ein *Rhodococcus equi*-Stamm aufgetragen (Abbildung 6).

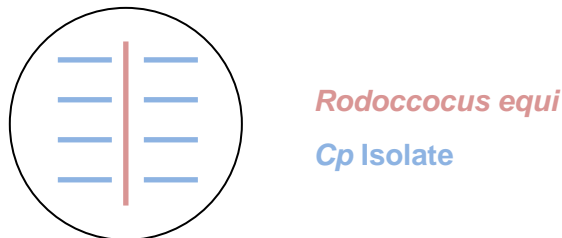


Abbildung 6: Hämolyse-Test Layout

Die Blutagarplatte wurde über Nacht bei +37°C und 5% CO₂ inkubiert, der Test wurde als positiv bewertet, wenn im Kreuzungsbereich von *Cp* und *Rhodococcus equi* eine vollständige Hämolyse zu sehen war (Fraser, 1961).

Da *Cp* ein relativ langsames Wachstum zeigt, wurde der Test im Rahmen dieser Arbeit leicht modifiziert: Die *Cp*-Isolate wurden zunächst allein über Nacht bei +37°C und 5% CO₂ bebrütet und danach *Rhodococcus equi* auf die Platte verimpft. Die Auswertung der Tests erfolgte nach erneuter Inkubation bei +37°C und 5% CO₂ über Nacht.

API® Coryne

Material

API® Coryne

REF: 20 900

bioMérieux (Suisse) SA

Durchführung

Der Test wurde gemäss der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

16S rDNA PCR

Neben der biochemischen Charakterisierung wurde von ausgewählten *Cp*-Isolaten die 16S rDNA mittels PCR amplifiziert und erhaltene Amplifikate anschliessend sequenziert.

Material

Thermocycler

GeneAmp PCR System 2400

Applied Biosystems

Amplifikation

Steriles Wasser

REF: 100 0 237

Laboratorium Dr. G. Bichsel AG

RNase free Water

Cat. Nr. 129112

Qiagen AG

HotStarTaq® Master Mix Kit

Cat. No. 203445

Qiagen AG

Primer 27F

5' – CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG – 3'

Eurofins Scientific AG

Primer 1492R

5' – TAC GG(CT) TAC CTT ACG ACT T – 3'

Eurofins Scientific AG

1kb DNA Ladder (Molekulargewichtsstandard)

REF: N3232L

New England BioLabs, in der Schweiz vertrieben von Bioconcept

Gel Loading Dye Blue (6x)

REF: B70215 (6x Concentrate)

New England BioLabs, in der Schweiz vertrieben von Bioconcept

GeneAmp PCR System 2400

Part. No. N8030002

Applied Biosystems Deutschland GmbH

*Aufreinigung***QIAquick® PCR Purification Kit**

Cat. No. 28104

Qiagen AG

*Gel-Elektrophorese***AGAROSE Standard** Molecular Biology Grade

REF: GEPAGA07-66

Eurobio

TAE-Puffer

- **TRIS (HYDROXYMETHYL) AMINOMETHANE** (C₄H₁₁NO₃)
Cat. No. 20092391
Biosolve B.V.
- **Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate, 99+%**
(Na₂EDTA)
REF: E5134-250G
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- **Essigsäure ROTIPURAN® 100%, p.a.** (C₂H₄O₂)
Art.-Nr. 3738.4
Roth AG

Zusammensetzung TAE Puffer:

TRIS (HYDROXYMETHYL) AMINOMETHANE 40 mM

Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate 1 mM

Essigsäure ROTIPURAN..... 40 mM

pH 8.5 ± 0.2

Ethidiumbromid (1%ige Lösung in Wasser) für Elektrophorese

REF: HC619938

Merck (Schweiz) AG Chemicals

Sequenzierung

4base-lab

Postfach 4023, 72771 Reutlingen, Deutschland, www.4base-lab.de

Datenbank

FASTA - Nucleotide Similarity Search

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/nucleotide.html>

Durchführung

PCR-Reaktion

Von einer Übernacht-Kultur wurde ca. eine halbe Öse mit Koloniematerial in 5 ml destilliertem Wasser gelöst und für 5 Minuten gekocht, um die Zellwände aufzuschliessen und die DNA freizusetzen. Das so gewonnene Material wurde als Template für die PCR verwendet.

Zunächst wurde ein Primer-Mix mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

0.2 µl 27 F Primer (100 pmol/µl)
0.2 µl 1492 R Primer (100 pmol/µl)
10.1 µl RNase freies H₂O

Dann folgte das Pipettieren des 25-µl PCR-Ansatzes:

12.5 µl Master-Mix
10.5 µl Primer-Mix
2.0 µl Template DNA

Danach wurde die Probe im Thermocycler mit folgendem Temperatur-Zeitprofil amplifiziert:

1 x	15 Minuten 95°C
30 Zyklen	
-	30 Sek. 94°C
-	30 Sek. 55°C
-	45 Sek. 72°C
1 x	10 Minuten 72°C
∞	4°C

Als Negativkontrolle wurde RNase freies Wasser ohne Template-DNA verwendet.

Aufreinigung

Anschliessend wurden die erhaltenen PCR-Amplifikate mit dem QIAquick® PCR Purification Kit nach Anleitung des Herstellers gereinigt.

Gel-Elektrophorese

Zur Überprüfung der 16S rDNA-Amplifikation wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und auf +50°C abgekühlt. Nach Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid wurde das Gel in einen Gelträger mit Kunststoffkamm gegossen. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer aufgefüllt bis das Gel vollkommen bedeckt war. Danach wurden 5 µl der Probe mit 1 µl Blaupuffer gemischt und in eine Tasche des Gels gefüllt. Ein Molekulargewichtsstandard (1kb-Ladder) wurde verwendet um die Grösse der Amplifikate zu bestimmen. Die Laufzeit betrug 40 Min. bei 75 Volt, danach wurde das Ergebnis unter UV-Licht ausgewertet und dokumentiert.

Sequenzierung

Die Amplifikate wurden im Anschluss sequenziert (4base-lab). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit bekannten Sequenzen aus der Datenbank verglichen (FASTA - Nucleotide Similarity Search; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/nucleotide.html>).

3.2 Inokulum für die Antibiotika Resistenz-Tests

Material

Branson 1200 Ultraschallbad

Bender+Hobein

Tween 20

No. 822184

Merck (Schweiz) AG Chemicals

PBS-Dulbecco

Cat. No. L 182-10

Biochrom AG

Eppendorf BioPhotometer

No. 6131 00062

Dr. Vaudaux AG

Durchführung

Mehrere Cp-Kolonien (5 bis 10) von einer bewachsenen Blutagarplatte wurden mit einem sterilen Wattetupfer aufgenommen und in 10 ml PBS-Dulbecco mit 0.05% Tween 20 suspendiert. Die Bakteriensuspension wurde für 10 Minuten bei 32 MHz im Ultraschallbad in

Eis-Wasser beschallt, um eine Erwärmung über 40°C zu verhindern (Methode adaptiert nach Gayen und Venkatesh, 2008).

Die Bakteriensuspension wurde mittels Photometer auf eine optische Dichte (OD_{600nm}) von 0.120 (± 0.005) eingestellt. Dies entspricht dem McFarland-Standard von 0.5 und einer Dichte von ca. 10^8 KBE/ml. Das Inokulum wurde innerhalb von 15 Minuten verwendet. So hergestelltes Inokulum wurde sowohl für die Agardiffusion als auch für die Bouillondilution verwendet. So konnten die beiden Methoden miteinander verglichen werden.

Zur Bestimmung der tatsächlichen Bakterienanzahl im Inokulum wurden 1 ml der Suspensionen entnommen und in log₁₀ Stufen verdünnt. Von jeder Stufe wurden je 100 µl auf zwei Schafblutagar ausgebracht und nach zwei Tagen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ wurden die Kolonien ausgezählt. In die Auswertung miteinbezogen wurde das Ergebnis derjenigen Verdünnungsstufen, deren Einzelkolonieanzahl auf der Blutplatte im ein- bis zweistelligen Bereich lag.

3.3 Antibiotika Resistenz-Test

Agardiffusion-Methode

Material

Sowohl die Nährmedien als auch die Antibiotika-Testplättchen und die zu deren Applikation verwendeten Stempel wurden, soweit nicht anders beschrieben, von der Firma Oxoid AG bezogen.

Nährmedien:

- **MH-Agar mit Schafblut** (Weiss, 1996)
REF: PB5007 A

Antibiotika-Testplättchen:

Penicillin G

P 10 iU, 5 x 50 discs
REF: CT0044B

Polymyxin B

PB 300 iU, 5 x 50 discs
REF: CT0044B

Ampicillin

AMP 10 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0003B

Colistin Sulfat

CT 10 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0017B

Oxacillin

OX 1 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0159B

Rifampicin

RD 5 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0207B

Cefepim

FEP 30 µg, 4 x 50 discs
REF: 66098

Cephalothin

KF 30 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0010B

Ceftiofur

EFT 30 µg, 5 x 50 discs
REF: CT1751B

Cephazolin

KZ 30 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0011B

Chloramphenicol

C 30 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0013B

Florfenicol

FFR 30 µg, 5 x 50 discs
REF: CT 1754B

Erytromycin

E 15 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0020B

Gentamicin

CN 10 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0024B

Clindamycin

DA 2 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0064B

Amikacin

AK 30 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0107B

Tetracyclin

TE 30 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0054B

Neomycin

N 30 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0033B

Enrofloxacin

ENR 5 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0639B
Baytril ®/ Reg. TM of Bayer

Marbofloxacin

MAR 5 µg, 4 x 50 discs
REF: 356 7628
Bio-Rad Laboratories AG

Tilmicosin

TIL 15 µg, 5 x 50 discs
REF: CT1756B

Azithromycin

AZM 15 µg, 5 x 50 discs
REF: CT 0906B

Imipenem

IPM 10 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0455B

Amoxicillin/Clavulansäure

AMC 30 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0223B

Vancomycin

VA 30 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0058B

Sulfamethoxazole/Trimethoprim

SXT 25 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0052B

Spectinomycin

SH 100 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0823B

Bacitracin

B 10 iU, 5 x 50 discs
REF: CT0005B

Metronidazol

MTZ 50 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0466B

Streptomycin

S 10 µg, 5 x 50 discs
REF: CT0047B

Die Anordnung der Plättchen auf der Agarplatte wurde an Hand der zu erwartenden Grösse der Hemmhöfe durch die antimikrobiellen Stoffe gewählt und wurde aus der Dissertation von L. Fuchs übernommen (Fuchs, 2009). Die Aufteilung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Durchführung

Die Agarplatten wurden nach CLSI Vorschrift M2-A9 mit der Bakteriensuspension beimpft und danach mit den Antibiotika-Testplättchen bestückt.

Es wurde ein Stempel mit je sechs Kartuschen verwendet (siehe nachfolgende Aufstellung). Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden bei +37°C bei normaler Atmosphäre.

Auswertung:

Mit Hilfe eines Messschiebers wurden die Durchmesser der Hemmhöfe auf 0.1 mm genau bestimmt und auf 1 mm gerundet. Genauere Messangaben waren aufgrund der teilweise nicht scharfen Trennlinien zwischen „Wachstum“ und „kein Wachstum“ nicht sinnvoll. Bei Wirkstoffen, die grössere Hemmhöfe ergaben als auf der Platte direkt abgelesen werden konnten, wurde der Radius gemessen und mit zwei multipliziert.

Tabelle 1: Verteilung der 29 verschiedenen Testplättchen auf die verschiedenen Agarplatten

Platte	Abkürzung	Antibiotischer Wirkstoff	Wirkstoffmenge pro Testplättchen
Platte 1	P	Penicillin G	10 iU
	PB	Polymixin B	300 iU
	AMP	Ampicillin	10 µg
	CT	Colistin	10 µg
	OX	Oxacillin	1 µg
	RD	Rifampicin	5 µg
Platte 2	FEP	Cefepim	30 µg
	KF	Cephalothin	30 µg
	EFT	Ceftifur	30 µg
	KZ	Cephlozolin	30 µg
	C	Chloramphenicol	30 µg
	FFC	Florfenicol	30 µg
Platte 3	E	Erythromycin	15 µg
	CN	Gentamicin	10 µg
	DA	Clindamycin	2 µg
	AK	Amikacin	30 µg
	TE	Tetracyclin	30 µg
	N	Neomycin	30 µg
Platte 4	ENR	Enrofloxacin	5 µg
	MAR	Marbofloxacin	5 µg
	TIL	Tilmicosin	15 µg
	AZM	Azithromycin	15 µg
	IPM	Imipenem	10 µg
	S	Streptomycin	10 µg
Platte 5	ACM	Amoxicillin/Clavulansäure (2:1)	30 µg
	VA	Vancomycin	30 µg
	SXT	Sulfamethoxazol/Trimethoprim (19:1)	25 µg
	SH	Spectinomycin	100 µg
	B	Bacitracin	10 iU
	MTZ	Metronidazol	50 µg

Material

- **MIC Plates for Testing of Veterinary Organisms; Sensititre®**

REF: NLV72

Trek Diagnostic Systems LTD.

Mueller-Hinton Broth mit 4.5% Pferdeblut (Weiss et al., 1996)

Horse lysed blood

REF: HB037

Oxoid AG

- **Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth with TES**

REF: T3462

Trek Diagnostic Systems LTD

Zusammensetzung:

Mueller-Hinton Broth Base21 g

TES Buffer 11.46 g

Ca⁺⁺20-25 mg

Mg⁺⁺ 10-12 mg

Lysiertes Pferdeblut4.5 %

In den Tabellen 2 und 3 ist das Layout für die MHK-Mikrotiterplatten zusammengefasst (Fuchs, 2009):

Tabelle 2: Wirkstoffkonzentrationen der MHK-Platten für die Cp-Isolate

Antibiotika	Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$]
Penicillin	0.0625 – 8
Ampicillin	0.0625 – 16
Amoxicillin/Clavulansäure	0.25/0.125 – 16/8
Oxacillin	0.125 – 2
Cephalothin	2 – 16
Cefazolin	2 – 8
Cefovecin	0.125 – 4
Cefquinom	0.5 – 4
Chloramphenicol	1 – 8
Tetracyclin	0.5 – 8
Sulfamethoxazol/Trimethoprim	2.4/0.15 – 38/2
Erythromycin	0.0625 – 4
Clindamycin	0.125 – 2
Amikacin	4 – 32
Gentamicin	0.5 – 4
Colistin	0.25 – 2
Rifampicin	0.25 – 2
Enrofloxacin	0.03 – 1

Tabelle 3: Wirkstoffkonzentrationen der MHK-Platten für die Referenzstämme

Antibiotika	Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$]
Penicillin	0.125 – 16
Ampicillin	0.125 – 32
Amoxicillin/Clavulansäure	0.5/0.25 – 32/16
Oxacillin	0.25 – 4
Cephalothin	4 – 32
Cefazolin	4 – 16
Cefovecin	0.25 – 8
Cefquinom	1 – 8
Chloramphenicol	2 – 16
Tetracyclin	1 – 16
Sulfamethoxazol/Trimethoprim	4.8/0.3 – 76/4
Erythromycin	0.125 – 8
Clindamycin	0.25 – 4
Amikacin	8 – 64
Gentamicin	1 – 8
Colistin	0.5 – 4
Rifampicin	0.5 – 4
Enrofloxacin	0.06 – 2

Durchführung

Das MH-Flüssigmedium wurde mit 100 μl des Inokulums beimpft, homogenisiert und in eine sterile Petrischale umgefüllt. Mit einer 8-Kanalpipette wurden alle 96 Vertiefungen mit 100 bzw. 50 μl befüllt und die Platte mit einem losen Deckel abdeckt. Um eine Austrocknung zu vermeiden wurden die Platten in einer feuchten Kammer inkubiert.

Die Platten wurden für 24 Stunden bei + 37°C ohne CO₂-Zusatz bebrütet. Danach wurde abgelesen und die Resultate in dem entsprechenden Auswertungsformular dokumentiert.

Zur Kontrolle der Reinheit wurde mit dem Rest des Inokulums eine Sterilitätskontrolle mittels fraktionierten Ausstrichs auf Blutagar gemacht.

Die Auswertung erfolgte mit einem Ablesespiegel bei Tageslicht. Als positiv wurde jedes mit bloßem Auge erkennbare Wachstum gewertet. Abbildung 7 zeigt ein Beispiel einer Auswertung, in Abbildung 8 ist die Schablone für die Auswertung der Sensititre®-MIC Platten dargestellt.

Name <u>Laiissa Fuchs</u>		Ref. No. <u>Kontrolle</u>
Ward/Dept <u>20.25</u>		Número do Malado / Patienten Nr
Saliv. Service Station / Abteilung		Physician
Culture Number <u>ATCC 25922</u>		Medizin Arzt
No de Culture Nr der Kulture		Date <u>8.5.2008</u>
Source / Site <u>DSH Z</u>		Date Datum
Source anal. of excretion / Anal. Herkunft der Probe		Organism <u>E. coli</u>
		Organisme Organismus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	—						○	○	—		○
B	○	—			○							
C	○	—			○	○	○					
D											○	○
E												
F	○	—										○
G												
H	○	—			○						✓	✓

SENSITITRE MADE IN THE UK

SENSITITRE®

Abbildung 7: Auswertungsformular der Sensititre® MIC Plates von MCS Diagnostics. In den gekennzeichneten Feldern konnte eine Trübung festgestellt werden. Die zwei Felder unten rechts entsprechen den Wachstumskontrollen. (Fuchs, 2009)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.5	PEN 1	PEN 2	PEN 4	PEN 8	PEN 16	AMC 0.5/0.25	AMC 1/0.5	AMC 2/1	AMC 4/2
B	AMP 0.125	AMP 0.25	AMP 0.5	AMP 1	AMP 2	AMP 4	AMP 8	AMP 16	AMP 32	AMC 8/4	AMC 16/8	AMC 32/16
C	OXA 0.25	OXA 0.5	OXA 1	OXA 2	OXA 4	CEL 4	CEL 8	CEL 16	CEL 32	CEZ 4	CEZ 8	CEZ 16
D	CEV 0.25	CEV 0.5	CEV 1	CEV 2	CEV 4	CEV 8	CEQ 1	CEQ 2	CEQ 4	CEQ 8	CHL 2	CHL 4
E	TET 1	TET 2	TET 4	TET 8	TET 16	SXT 4.8/0.3	SXT 9.5/0.5	SXT 19/1	SXT 38/2	SXT 76/4	CHL 8	CHL 16
F	ERY 0.125	ERY 0.25	ERY 0.5	ERY 1	ERY 2	ERY 4	ERY 8	CLI 0.25	CLI 0.5	CLI 1	CLI 2	CLI 4
G	AMI 8	AMI 16	AMI 32	AMI 64	GEN 1	GEN 2	GEN 4	GEN 8	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4
H	RIF 0.5	RIF 1	RIF 2	RIF 4	ENR 0.06	ENR 0.125	ENR 0.25	ENR 0.5	ENR 1	ENR 2	GC 0	GC 0

Abbildung 8: Schablone für die Auswertung der Sensititre®-Resultate wenn die Platte mit 50 µl beimpft wurde. (Fuchs, 2009)

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der *C. pseudotuberculosis* Isolate

Alle *Cp* Isolate, die im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Antibiotika-Empfindlichkeit untersucht wurden, wurden zunächst charakterisiert. Phänotypisch untersucht wurden die Koloniemorphologie und das Hämolyseverhalten auf Schafblutagar sowie das mikroskopische Bild nach Gramfärbung. Weiterhin wurde das Vorhandensein bakterieller Katalase überprüft, ein Hämolyse-Test in Co-Kultur mit *Rhodococcus equi* sowie eine biochemische Differenzierung mittels API[®] Coryne durchgeführt. Die eigenen Untersuchungen, dargestellt in Tabelle 4, bestätigten die Ergebnisse der bakteriologischen Routinediagnostik: alle ausgewählten Isolate konnten eindeutig als *Cp* identifiziert werden. Von ausgewählten Isolaten (n = 10) wurde stellvertretend die 16S rDNA mittels PCR amplifiziert und die erhaltenen Sequenzen mit Datenbankeinträgen verglichen. Dabei konnte für alle untersuchten Isolate eine 98-99%ige Identität mit publizierten 16S rDNA Sequenzen von *Cp* nachgewiesen werden. Für die weiteren Arbeiten wurden alle Isolate drei Mal subkultiviert.

Tabelle 4: Im Test verwendete Isolate

<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>					
Nr.	Tierart	Probenmaterial	Hämolyse-Test mit <i>R. equi</i>	Hämolyse	Katalase
1	Schaf	Abszess	+	+	+
2			+	+	+
3			+	+	+
4			+	+	+
5			+	+	+
6		Lunge	+	+	+
7		unbekannt	+	+	+
8			+	+	+
9			+	+	+
10			+	+	+
11			+	+	+
12			+	+	+
13			+	+	+
14			+	+	+
15			+	+	+
16			+	+	+
17			+	+	+
18			+	+	+
19			+	+	+
20			+	+	+
21			+	+	+
22			+	+	+

<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>					
Nr.	Tierart	Probenmaterial	Hämolyse-Test mit <i>R. equi</i>	Hämolyse	Katalase
23	Ziege	Eitertupfer	+	+	+
24			+	+	+
25			+	+	+
26			+	+	+
27		Wundmaterial	+	+	+
28			+	+	+
29			+	+	+
30		Abszess (Sternum)	+	+	+
31		Abszess (Ohr)	+	+	+
32		Abszess (Hals)	+	+	+
33		Abszess (Kopf)	+	+	+
34			+	+	+
35			+	+	+
36		Abszess (Euter)	+	+	+
37		Abszess (unbekannt)	+	+	+
38			+	+	+
39			+	+	+
40			+	+	+
41		Lymphknoten	+	+	+
42			+	+	+
43			+	+	+
44			+	+	+
45			+	+	+
46			+	+	+
47			+	+	+
48			+	+	+
49			+	+	+

50	Ziege	unbekannt	+	+	+
51			+	+	+
52			+	+	+
53			+	+	+
54			+	+	+
55			+	+	+
56			+	+	+
57			+	+	+
58			+	+	+
59			+	+	+
60			+	+	+
61			+	+	+
62			+	+	+

4.2 Adaptierung der Antibiotika-Empfindlichkeitstestung für

C. pseudotuberculosis

Aufgrund der Wachstumsbesonderheiten von *Cp* (Aneinanderhaften der Bakterien, relativ langsames Wachstum) wurden mögliche Modifizierungen der von der CLSI definierten Standardmethode für die Mikrobouillondilution (weiterhin MHK-Testung genannt) und die Agardiffusion untersucht (CLSI 2008).

4.2.1 Herstellung des Inokulums

Bei der Herstellung des Inokulums (i.e. Suspendierung von 5 - 10 *Cp*-Kolonien in NaCl-Lösung) zeigte sich, dass durch verschiedene Suspendierungsmethoden wie intensives Resuspendieren mit der Pipette und Mischen auf einem Labormischgerät kein homogenes *Cp*-Inokulum hergestellt werden konnte. Daher wurde eine Homogenisierungsmethode von Gayen und Venkatesh (2008) zur Bestimmung der Zellgrößenverteilung bei *Corynebacterium glutamicum* für *Cp* adaptiert. Entsprechend des Originalprotokolls wurden Kolonien von *Cp* in 5 ml 0.02 M Phosphat-Puffer gelöst und im Ultraschallbad für 5 Minuten beschallt. Dann wurde 2 ml Streptomycin (0.01 g/ml) zugegeben und die Probe für 10 Minuten inkubiert. Danach wurde 5 ml 0.1% Tween 20 Lösung zugegeben und nochmals für 8 Minuten beschallt. Die Prozedur wurde im 4°C kalten Eisbad durchgeführt. Die Anwendung des Originalprotokolls von Gayen und Venkatesh (2008) ermöglichte die Herstellung eines

homogenen *Cp*-Inokulums. Die nachfolgende Wachstumskontrolle ergab eine 50%ige Reduktion der Anzahl viabler Bakterien. Daher wurden Modifikationen des Protokolls durchgeführt. Das beste Ergebnis i.e. homogene *Cp* Suspension mit der grössten Anzahl an viablen Bakterien wurde erzielt unter Verwendung von Phosphatpuffer mit 0.05% Tween 20 ohne Streptomycin-Supplementierung und einmaliger 10-minütiger Beschallung auf Eis im Ultraschallbad.

Im nächsten Schritt wurden Untersuchungen zur Einstellung der in den CLSI Richtlinien vorgeschriebenen Inokulumsdichte durchgeführt. Vorgeschrieben ist, dass eine Bakteriensuspension mit einer Dichte von 1×10^8 KBE/ml hergestellt und dann auf die endgültige Dichte von 5×10^5 KBE/ml (1:200) verdünnt wird. Dazu wurden *Cp*-Suspensionen nach dem neu adaptierten Protokoll hergestellt und auf eine optische Dichte entsprechend dem McFarland-Standard von 0.5 eingestellt, die nach Angaben in den CSLI-Dokumenten einer Bakterienanzahl von ca. 1×10^8 KBE/ml entsprechen sollte. Für diese Suspension konnte eine korrespondierende optische Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von $0.12 (\pm 0.05)$ nachgewiesen werden. Die photometrische Messung der OD_{600nm} stellt eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Bakterienzahl im Inokulum dar und hat den Vorteil, dass keine visuelle und personenabhängige, sondern eine photometrische Einstellung erfolgt. Da die Zellgrösse und Oberfläche für die Lichtabsorption und damit für die Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer eine Rolle spielt, wurden die Bakterien für definierte OD_{600nm} Werte, die tatsächliche Bakteriendichte der auf $OD_{600nm} = 0.12 (\pm 0.05)$ eingestellten Suspensionen von *Cp* ($n=5$), mittels Ausplattierung bestimmt. Tabelle 5 zeigt die Mittelwerte dieser Untersuchungen. Aus diesen Werten ergibt sich, dass die durchschnittliche Bakteriendichte einer auf $OD_{600nm} = 0.12$ eingestellten *Cp*-Suspension bei 8.5×10^7 KBE/ml liegt und so als Ausgangsbakteriensuspension Inokulum für die Empfindlichkeitstestung sowohl für die MHK-Testung als auch Agardiffusion verwendet werden kann.

Tabelle 5: Mittelwerte der ausgezählten Kolonien

Stammnummer	[CFU/100µl]
25	7.05×10^7
26	10.35×10^7
4	8.86×10^7
5	7.50×10^7
7	8.55×10^7

4.2.2 Auswahl des Mediums

MHK-Testung

Mit Standardmedium (Kationen-adjustiertes Mueller-Hinton Medium; MH) war nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C unter aeroben Bedingungen ohne Supplementierung kein für eine Auswertung der MHK-Testplatte ausreichendes bakterielles Wachstum sichtbar. Durch den Zusatz von 4.5% lysiertem Pferdeblut zum Standardmedium konnte nach 24 Stunden ein für die Auswertbarkeit der MHK-Bestimmung ausreichendes *Cp*-Wachstum nachgewiesen werden. Der Zusatz von 4.5% Pferdeblut ist gemäss der CLSI-Richtlinie zulässig. Daher wurden bei der Herstellung des Inokulums von 11-ml MH-Medium 495 µl durch 495 µl lysiertes Pferdeblut ersetzt.

Agardiffusion

Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und aeroben Bedingungen war das *Cp*-Wachstum auf Standard-MH-Agar schlecht sichtbar. Dadurch war eine Bewertung von Hemmhofdurchmessern nicht möglich. Das *Cp*-Wachstum auf MH-Agar mit Schafblut-Zusatz war nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und aeroben Bedingungen deutlich sichtbar. Unter diesen Bedingungen war eine Auswertung von Hemmhofdurchmessern möglich. Alle weiteren Untersuchungen mittels Agardiffusion wurden mit MH-Agar mit Schafblut-Zusatz durchgeführt. MH-Agar mit Schafblut-Zusatz ist von der CLSI zugelassen und wurde von Weiss et al. (1996) für *Cp* ebenfalls verwendet.

4.2.3 Optimierung der Inkubationsbedingungen

Die MHK-Testplatten wurden standardmässig nach der Beimpfung mit einer luftdichten Plastikfolie verschlossen, um sie vor Kontamination und Austrocknung zu schützen. Dabei war das Wachstum von *Cp* nach 24 Stunden nicht ausreichend und kein Ablesen der MHK möglich. Daher wurden die Inkubationsbedingungen modifiziert. Die luftdichte Plastikfolie wurde durch einen lose aufgesetzten Deckel ersetzt. Dadurch wurde ein für die MHK-Auswertung ausreichendes Wachstum erreicht. Mit dieser Methode zeigten die MHK-Platten nach 24 Stunden Inkubation eine signifikante Reduktion des Mediums in den Plattenvertiefungen (Verdunstung). Die Verdunstung wurde durch die Inkubation der beimpften Platten in einer feuchten Kammer minimiert.

4.2.4 Festlegung von Grenzwerten („break points“) für die MHK-Testung

Anhand von Grenzwerten („break points“) wurden aus den ermittelten quantitativen Werten der MHK die qualitativen Aussagen „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ ermittelt. Für *Cp* gibt es bislang keine durch CLSI Normen oder Normen anderer anerkannter Institutionen festgelegte „break points“ für die Empfindlichkeitstestung. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die für Staphylokokken festgelegten Grenzwerte zur Auswertung der *Cp*-Empfindlichkeitstests verwendet, da sowohl *Cp* als auch Staphylokokken im Wirt die Bildung von Abszessen induzieren („break points“ für *Staphylococcus* spp. nach CLSI M31-A3)

4.3 Ergebnisse der getesteten Stämme

Die MHK-Testung war für alle *Cp* Isolate (n=60) nach dem neu adaptierten Protokoll ohne Schwierigkeiten ablesbar und damit auswertbar. Die in der MHK mitgeführten Referenzstämme blieben bei Anwendung des neu für *Cp*-adaptierten Testprotokolls in den von der CLSI angegebenen Referenzbereichen. Die Resultate für alle *Cp*-Isolate sind in Tabelle 6 aufgeführt, die Tabellen 7 und 8 zeigen die Resultate getrennt für Schaf- und Ziegen-Isolate.

Alle getesteten Isolate konnten nach den verwendeten „break points“ als „sensibel“ für Amoxicillin, Cephalothin, Cefazolin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Erythromycin, Clindamycin, Amikacin und Gentamicin eingestuft werden. Für Penicillin zeigte sich ein anderes Bild mit 80% (n=48) Isolaten deren MHK bei ≥ 0.25 mg/ml lag und die somit als „resistent“ beurteilt wurden. Für 20% (n=12) der *Cp*-Isolate lag die MHK für Penicillin bei ≤ 0.13 mg/ml und damit im „sensiblen“ Bereich. Bei der genauen Betrachtung der tierartlichen Herkunft der Isolate waren bei den untersuchten Schaf-Isolaten 76% Penicillin-„resistent“ und 24% „sensibel“, bei den Ziegenisolaten 82% Penicillin-„resistent“ und 18% „sensibel“. Für das Antibiotikum Ampicillin waren 10% (n=4) der *Cp*-Isolate „resistent“ mit einer MHK von 0.5 mg/ml und 90% (n=56) „sensibel“ (MHK ≤ 0.25 mg/ml). Alle Ampicillin-resistenten *Cp*-Isolate stammten aus der Ziege. Gegenüber Oxacillin waren 100% (n=60) der *Cp*-Isolate „resistent“ mit MHK-Werten von ≥ 0.5 mg/ml. Für Enrofloxacin konnten 98% (n=59) als „sensibel“ eingestuft werden, 2% (n=1) wurde mit einem MHK von 1 mg/ml als „intermediär“ erkannt, dieses Isolat stammte aus dem Schaf.

Vergleichend wurden alle Isolate mittels Agardiffusion getestet. Für die Antibiotika Amoxicillin/Clavulansäure, Cephalothin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Erythromycin, Clindamycin, Amikacin und Gentamicin konnten mit der MHK-Testung übereinstimmende Ergebnisse gefunden werden. Alle getesteten *Cp*-Isolate waren in beiden Testsystemen für diese Antibiotika sensibel. Für die Wirkstoffe Penicillin, Oxacillin

und Enrofloxacin divergierten die Ergebnisse der Agardiffusion von denen der MHK-Testung: für Penicillin waren in der Agardiffusion 4 *Cp*-Isolate (6.7%) resistent und 93.3% (n=56) empfindlich, für Oxacillin waren in der Agardiffusion 85.0% (n=51) resistent und 9 sensibel und für Enrofloxacin waren alle sensibel. Zusätzlich in der Agardiffusion wurde die Empfindlichkeit gegenüber Polymyxin B getestet. Alle *Cp*-Isolate waren empfindlich. Die Tabellen 9 bis 23 geben einen Überblick über die Korrelation zwischen Auswertung der Hemmhofdurchmesser und den Ergebnissen der MHK-Testung. Zusätzlich wurde für alle Wirkstoffe eine zusammenfassende Auswertung erstellt, die in Tabelle 24 dargestellt ist.

Tabelle 6: Resultate aller getesteten Isolate

Corynebacterium pseudotuberculosis (n=60)																
Antibiotikum	MHK [mg/L]													S [%]	I [%]	R [%]
	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128			
Penicillin G ²		0	12	47	1	0	0	0	0	0				20	-	80
Ampicillin ²		0	12	44	4	0	0	0	0	0	0			93	-	7
Amoxicillin-Clavs. ²			58	2	0	0	0	0	0	0				100	-	0
Oxacillin ²			0	0	3	38	19	0						0	-	100
Cephalothin ¹							60	0	0	0	0	0		100	0	0
Cefazolin ¹							60	0	0	0	0			100	0	0
Cefovecin ⁵			0	0	1	21	38	0	0					-	-	-
Cefquinom ⁵					53	7	0	0	0					-	-	-
Chloramphenicol ³						3	53	4	0	0				100	0	0
Tetracyclin ²					59	0	1	0	0					100	0	0
Sulfamethox.-Trp. ²		0	14	44	2	0	0	0						100	-	0
Erythromycin ²		60	0	0	0	0	0	0	0					100	0	0
Clindamycin ⁴			58	2	0	0	0	0						100	0	0
Amikacin ¹								1	50	9	0	0	0	100	0	0
Gentamicin ¹					1	15	43	1	0					100	0	0
Colistin ⁵				0	0	0	0	60						-	-	-
Rifampin ⁵				60	0	0	0	0						-	-	-
Enrofloxacin ⁴	0	21	37	1	0	1	0							98	2	0

¹ „break points“ für Tierpathogene nach CLSI M31-A3 für pathogene Keime der Veterinärmedizin

² „break points“ für *Staphylococcus* spp. nach CLSI M31-A3

³ „break points“ für andere als Streptokokken nach CLSI M31-A3

⁴ Hautinfektion von Hunden (*Staphylococcus* spp.) nach CLSI M31-A3

⁵ keine anerkannten CLSI-„break points“ vorhanden

Tabelle 7: Resultate aller Isolate aus Ziegen

Corynebacterium pseudotuberculosis von Ziegen (n=39)																
Antibiotikum	MHK [mg/L]													S [%]	I [%]	R [%]
	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128			
Penicillin G ²		0	7	31	1	0	0	0	0	0				18	-	82
Ampicillin ²		0	7	28	4	0	0	0	0	0	0			90	-	10
Amoxicillin-Clavs. ²			37	2	0	0	0	0	0	0				100	-	0
Oxacillin ²			0	0	1	24	14	0						0	-	100
Cephalothin ¹							39	0	0	0	0			100	0	0
Cefazolin ¹							39	0	0	0	0			100	0	0
Cefovecin ⁵			0	0	0	15	24	0	0					-	-	-
Cefquinom ⁵					35	4	0	0	0					-	-	-
Chloramphenicol ³						1	36	2	0	0	0			100	0	0
Tetracyclin ²					39	0	0	0	0	0				100	0	0
Sulfamethox.-Trp. ²		0	11	27	1	0	0	0	0					100	-	0
Erythromycin ²		39	0	0	0	0	0	0	0					100	0	0
Clindamycin ⁴			38	1	0	0	0	0						100	0	0
Amikacin ¹								0	33	6	0	0		100	0	0
Gentamicin ¹					0	11	27	1	0					100	0	0
Colistin ⁵				0	0	0	0	39						-	-	-
Rifampin ⁵				39	0	0	0	0						-	-	-
Enrofloxacin ⁴	0	13	25	1	0	0	0							100	0	0

¹ „break points“ für Tierpathogene nach CLSI M31-A3 für pathogene Keime der Veterinärmedizin

² „break points“ für *Staphylococcus* spp. nach CLSI M31-A3

³ „break points“ für andere als Streptokokken nach CLSI M31-A3

⁴ Hautinfektion von Hunden (*Staphylococcus* spp.) nach CLSI M31-A3

⁵ keine anerkannten CLSI-„break points“ vorhanden

Tabelle 8: Resultate aller Isolate aus Schafen

Corynebacterium pseudotuberculosis von Schafen (n=21)																
Antibiotikum	MHK [mg/L]													S [%]	I [%]	R [%]
	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128			
Penicillin G ²		0	5	16	0	0	0	0	0	0				24	-	76
Ampicillin ²		0	5	16	0	0	0	0	0	0	0			100	-	0
Amoxicillin-Clavs. ²			21	0	0	0	0	0	0	0				100	-	0
Oxacillin ²			0	0	2	14	5	0						0	-	100
Cephalothin ¹							21	0	0	0	0			100	0	0
Cefazolin ¹							21	0	0	0	0			100	0	0
Cefovecin ⁵			0	0	1	6	14	0	0					-	-	-
Cefquinom ⁵					18	3	0	0	0					-	-	-
Chloramphenicol ³						2	17	2	0	0				100	0	0
Tetracyclin ²					20	0	1	0	0	0				100	0	0
Sulfamethox.-Trp. ²		0	3	17	1	0	0	0	0					100	-	0
Erythromycin ²		21	0	0	0	0	0	0	0					100	0	0
Clindamycin ⁴			20	1	0	0	0	0	0					100	0	0
Amikacin ¹								1	17	3	0	0		100	0	0
Gentamicin ¹					1	4	16	0	0	0				100	0	0
Colistin ⁵				0	0	0	0	21						-	-	-
Rifampin ⁵				21	0	0	0	0						-	-	-
Enrofloxacin ⁴	0	8	12	0	0	1	0							95	5	0

¹ „break points“ für Tierpathogene nach CLSI M31-A3 für pathogene Keime der Veterinärmedizin

² „break points“ für *Staphylococcus* spp. nach CLSI M31-A3

³ „break points“ für andere als Streptokokken nach CLSI M31-A3

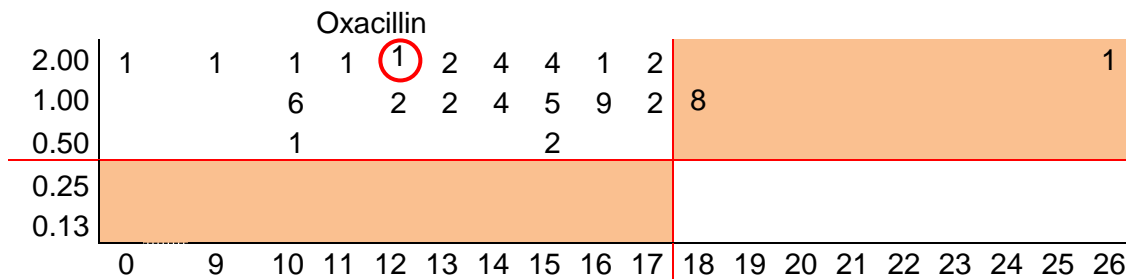
⁴ Hautinfektion von Hunden (*Staphylococcus* spp.) nach CLSI M31-A3

⁵ keine anerkannten CLSI-„break points“ vorhanden

Auswertung von Agardiffusion und Mikrobouillondilution

Die Resultate der Agardiffusion sind in den Tabellen 9 bis 23 dargestellt. Die Darstellung der Resultate der Agardiffusion wurde in Bezug auf die Bouillonmikrodilution in die Diagramme eingetragen.

Bsp: Ein Isolat zeigte für Oxacillin in der Agardiffusion ein Hemmhofdurchmesser von 11 mm in der Bouillonmikrodilution wurde ein MHK von 2 mg/L ermittelt.



Zusätzlich wurden mit roten Linien die schon in Tabelle 6-8 verwendeten „break points“ sowohl für die Agardiffusion wie auch für die Mikrobouillondilution eingezeichnet (sind keine roten Linien vorhanden, liegen die „break points“ ausserhalb der Grafik). Daraus lässt sich ablesen, inwiefern beide Testmethoden übereinstimmen. „Major errors“ sind dunkel-orange, „minor errors“ hell-orange hinterlegt. Zu beachten ist, dass keine „break points“ für C_p existieren und die verwendeten Werte nur Annäherungen darstellen (siehe Kapitel 7.2).

Tabelle 9: Resultate der Agardiffusion für Penicillin

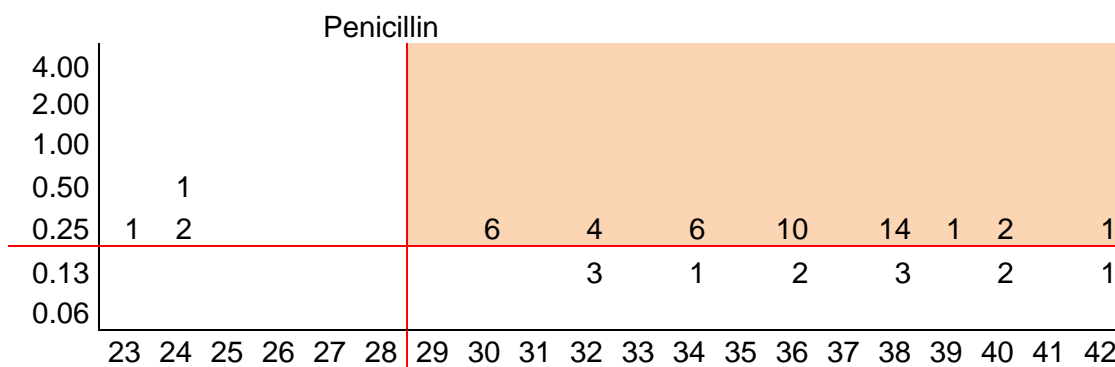


Tabelle 10: Resultate der Agardiffusion für Oxacillin

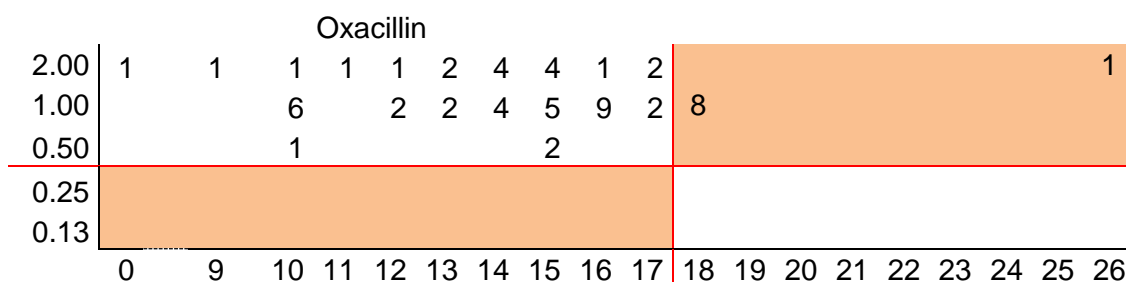


Tabelle 11: Resultate der Agardiffusion für Cephalothin

Cephalothin*															
16.00															
8.00															
4.00															
2.00	2		9		16		17	1	10		2		1		
	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48		

* als sensibel in der Agardiffusion gelten hier Durchmesser von ≥ 18 mm

Tabelle 12: Resultate der Agardiffusion für Chloramphenicol

Chloramphenicol*														
8.00														
4.00														
2.00	7		3		15		8		12		7		1	
1.00														
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43

* als sensibel in der Agardiffusion gelten hier Durchmesser von ≥ 18 mm

Tabelle 13: Resultate der Agardiffusion für Erythromycin

Erythromycin																		
1.00																		
0.50																		
0.25																		
0.06	3				1	2		1		9		13		12	1	12		3
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	50

Tabelle 14: Resultate der Agardiffusion für Gentamicin

Gentamicin												
4.00												
2.00		1		2	8	7	16	6	3			
1.00	2	3	1		4				3		1	1
0.50												
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	38

Tabelle 15: Resultate der Agardiffusion für Clindamycin

Clindamycin													
2.00													
1.00													
0.50													
0.25													
0.13	1			2	5	9	6	16	3	8		3	1
	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39

Tabelle 16: Resultate der Agardiffusion für Amikacin

Amikacin															
32.00															
16.00			3 3												
8.00			3	6	8	15	4	3		4		1		1	
4.00			1												
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	38

Tabelle 17: Resultate der Agardiffusion für Tetracyclin

Tetracyclin*													
8.00													
4.00													
2.00							1						
1.00													
0.50	2	5	3	20	6	12	2	7				2	
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	

* als sensibel in der Agardiffusion gelten hier Durchmesser von ≥ 19 mm

Tabelle 18: Resultate der Agardiffusion für Enrofloxacin

Enrofloxacin*													
2.00													
1.00							1						
0.50													
0.25			1										
0.13	4		3	3	11	1	14		1				
0.06	1			2	3	1	3		2		7	1	1
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42

* als sensibel in der Agardiffusion gelten hier Durchmesser von ≥ 23 mm

Tabelle 19: Resultate der Agardiffusion für Amoxicillin/Clavulansäure

Amoxicillin/Clavulansäure*																			
8.00																			
4.00																			
2.00																			
1.00																			
0.50																			
0.25																			
0.13	3		3		5		2	9	1	9	1	16		4		6			1
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48

* als sensibel in der Agardiffusion gelten hier Durchmesser von ≥ 20 mm

Tabelle 20: Resultate der Agardiffusion für Sulfamethoxazol/Trimethoprim

Sulfamethoxazol/Trimethoprim*														
2.00														
1.00														
0.50	1										1			
0.25					6	7	16	7	5	3				
0.13					1	3	3	4	2	1				
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39

* als sensibel in der Agardiffusion gelten hier Durchmesser von ≥ 16 mm

Tabelle 21: Resultate der Agardiffusion für Ampicillin

Ampicillin														
2.00														
1.00														
0.50	1	1	2											
0.25	2	1		3	2	5	8	7	6	2	4	1	1	1
0.13		1	1				2	3	2		2		1	
	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	52

Tabelle 22: Resultate der Agardiffusion für Cefazolin

Cefazolin*														
4.00														
2.00	1							1	3	6	11	20	8	7
1.00														1
0.50														1
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36

* als sensibel in der Agardiffusion gelten hier Durchmesser von ≥ 18 mm und der MHK für sensibel liegt bei ≤ 8 µg/mL

Tabelle 23: Resultate der Agardiffusion für Rifampin

Rifampin														
0.50														
0.25	1							1	1	1	7	17	20	9
0.13														3
	4	16	17	18	19		24	30	36	37	38	39	40	41

Tabelle 24: Zusammenfassende Auswertung der Agardiffusion (Adif) und MHK-Bestimmung (Bdil).

Penicillin				
n= 60	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	12	-	44
	I	-	-	-
	R	0	-	4

Gentamicin				
n= 60	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	60	0	0
	I	0	0	0
	R	0	0	0

Oxacillin				
n= 60	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	0	-	9
	I	-	-	-
	R	0	-	51

Clindamycin				
n= 60	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	60	0	0
	I	0	0	0
	R	0	0	0

Cephalothin				
n= 58*	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	58	0	0
	I	0	0	0
	R	0	0	0

* Fehlende Stämme: 40, 33

Amikacin				
n= 53*	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	53	0	0
	I	0	0	0
	R	0	0	0

* Fehlende Stämme: 2, 7, 15, 16, 17, 18, 33,

Chloramphenicol				
n= 59	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	59	0	0
	I	0	0	0
	R	0	0	0

* Fehlender Stamm: 33

Tetracyclin				
n= 60	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	60	0	0
	I	0	0	0
	R	0	0	0

Erythromycin				
n= 60	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	60	0	0
	I	0	0	0
	R	0	0	0

Enrofloxacin				
n= 60	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	59	1	0
	I	0	0	0
	R	0	0	0

Amoxicillin/Clavulansäure				
n= 60	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	60	-	0
	I	-	-	-
	R	0	-	0

Sulfamethoxazol/Trimethoprim				
n= 60	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	60	-	0
	I	0	-	0
	R	0	-	0

Ampicillin				
n= 59*	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	53	-	3
	I	-	-	-
	R	2	-	1

* Fehlender Stamm: 38

Cefazolin				
n= 59*	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	59	0	0
	I	0	0	0
	R	0	0	0

* Fehlender Stamm: 33

Rifampin				
n= 60	Bdil			
Adif		S	I	R
	S	59	0	0
	I	0	0	0
	R	1	0	0

5 Diskussion

Weltweit zunehmende Resistenzen gegen Antibiotika stellen sowohl die Human- als auch die Veterinärmedizin vor immer grösser werdende Probleme. Als Ursachen werden sowohl ein unsachgemässer Einsatz von Antibiotika in der Humanmedizin als auch übermässiger und unregelmässiger Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen in der Tierhaltung bzw. Veterinärmedizin diskutiert. Die Resistenz-Situation in der Schweiz ist im internationalen Vergleich nach wie vor günstig, jedoch zeichnet sich bei einigen Erreger-Antibiotika-Kombinationen eine Verschlechterung ab (Schweizerisches Bundesamt für Veterinärwesen; siehe: <http://www.bvet.admin.ch/themen/lebensmittel/00344/index.html?lang=de>).

Sicherlich kann auf Antibiotika zur Therapie von Infektionskrankheiten bei Tieren aktuell und auch in Zukunft nicht verzichtet werden. Die wirksame Bekämpfung dieser Krankheiten ist aus Gründen des Tierschutzes, zur Vermeidung der Ausbreitung von Krankheiten und zur Gewährleistung qualitativ hochwertiger und sicherer tierischer Lebensmittel notwendig. Da prinzipiell jeder Einsatz eines Antibiotikums zur Entwicklung von Resistenzen führen kann, müssen strenge Richtlinien für den Einsatz von antibiotisch wirksamen Arzneimitteln in der Tiermedizin gelten („Antibiotika-Leitlinien“; siehe <http://www.bundestieraerztekammer.de>). Dabei ist wichtig, dass der kontrollierte und gezielte Einsatz in der Praxis mit objektivierbaren diagnostischen Massnahmen wie Erregerdifferenzierung mit nachfolgendem Antibiogramm abgesichert wird (Kietzmann et al., 2004). Daher spielt die Etablierung von validen Methoden zur Bestimmung und Beurteilung von Resistenzen im Labor eine entscheidende Rolle (Schwarz et al., 2003). Solche Methoden ermöglichen zudem das Monitoring der aktuellen Resistenzsituation sowie der zukünftigen Entwicklungen (Wallmann et al., 2003, 2004).

Für bestimmte veterinärmedizinisch relevante Bakterien (z.B. Staphylokokken, Streptokokken, *Enterobacteriaceae*) existieren validierte Verfahren zur Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber den wichtigsten Antibiotika (CLSI 2008). Für andere Bakterien dagegen, wie z.B. *Cp*, gibt es sehr wenige Untersuchungen zur Antibiotika-Empfindlichkeit und auch zur dazugehörigen Methodik. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung/Adaptierung von Methoden zur Empfindlichkeitstestung für *Cp*. Es stehen verschiedene Methoden wie z.B. die Agardiffusion und die Mikrobouillondilution für die Empfindlichkeitstestung zur Verfügung. Dabei gewinnt die Bestimmung der MHK in den letzten Jahren in der Veterinärmedizin immer mehr an Bedeutung. Ein unter standardisierten *in vitro* Bedingungen ermittelter MHK erlaubt eine Aussage darüber, ob mit einer bestimmten Sicherheit eine ausreichend grosse Gewebekonzentration im infizierten Tier erreicht werden kann, bei der anzunehmen ist, dass der zu behandelnde Krankheitserreger gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum empfindlich ist (Kietzmann et al., 2004). Diese Aussage ist notwendig für einen sorgfältigen Einsatz von Antibiotika in der Praxis. Daher wurde in dieser

Arbeit die MHK-Bestimmung mittels Mikrobouillondilution für *Cp* nach den Vorschriften der CLSI etabliert. Aufgrund spezifischer Wachstumseigenschaften von *Cp* wurden einige Parameter der CLSI-Methode (CLSI 2008) modifiziert. So wurde zur Herstellung eines homogenen Inokulums eine Behandlung der Bakteriensuspension mittels Ultraschallbad eingeführt, da *Cp*, ähnlich wie *C. glutamicum* in der Kultur aneinander haftet (Gayen und Venkatesh, 2008). Dadurch konnte das Inokulum auf die in den CLSI-Normen geforderte Bakterienzahl eingestellt werden. Des weiteren konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass der in der CLSI-Norm verwendete McFarland-Standard von 0.5 zur Standardisierung der eingesetzten Bakterienmenge für *Cp* geeignet ist, um das Inokulum auf die geforderte Bakterienzahl von 10^8 KBE/ml einzustellen. Der McFarland Standard von 0.5 wurde für *Cp* auf einen photometrischen OD_{600nm} Wert abgeglichen, da die photometrische Messung der Bakteriendichte Personen-unabhängig und damit objektiver einsetzbar ist. Die im CLSI-Dokument angegebene Kationen-adjustierte Müller-Hinton-Bouillon als Mittel der Wahl für die Empfindlichkeitstestung mittels Mikrobouillondilution hat sich als nicht geeignet für die Empfindlichkeitstestung von *Cp* gezeigt. Das Wachstum in den Testplatten war nicht ausreichend für eine Auswertung der MHK-Bestimmung. Daher wurden dem Medium 4.5 % lysiertes Pferdeblut zugesetzt (Weiss, 1996; CLSI 2006 b) und die Inkubationsbedingungen modifiziert. Die besten Ergebnisse konnten erzielt werden nach Inkubation in einer feuchten Kammer. All diese Modifikationen erlaubten eine zweifelsfreie Ablesung von MHK-Werten nach 24 Stunden sowohl für die getesteten *Cp* Isolate als auch für die mitgeführten Kontroll-Stämme.

Entscheidend für die Beurteilung der Empfindlichkeitstestung ist das Festlegen von therapeutisch relevanten Grenzwerten oder „break points“, die eine Beurteilung der ermittelten MHK-Werte in „empfindlich“, „intermediär empfindlich“ oder „resistent“ erlauben. Diese „break points“ werden aufgrund mikrobiologischer Kriterien, chemisch-physikalischer Eigenschaften des Wirkstoffs, dessen pharmakokinetischen und toxikologischen Profils sowie klinischen Kenntnissen festgelegt (Kietzmann et al., 2004). Neben der klassischen Einteilung der antibiotischen Wirkstoffgruppen bezüglich ihrer Stoffklasse (z.B. beta-Lactame, Aminoglycoside, Tetracycline) und ihres Wirkungsortes (z.B. Zellwand-Synthese, Protein-Biosynthese) spielt die Einteilung in konzentrationsabhängig wirksame Antibiotika (Aminoglycoside und Fluorchinolone) und zeitabhängig wirkende Antibiotika (alle anderen Wirkstoffe) eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Infektionen und somit auch bei der Festlegung von Grenzwerten (Craig, 1995, 1998; Kietzmann et al., 2004). Solche spezifischen Grenzwerte existieren für *Cp* weder in CLSI-Dokumenten noch in anderen einschlägigen Dokumenten. Daher wurden für diese Arbeit die Grenzwerte für Staphylokokken verwendet aufgrund der Ähnlichkeit bezüglich Lokalisation und Krankheitsbild (Abszessbildung bei Schaf und Ziege).

Unter Verwendung der neu adaptierten Mikrobouillondilution und der „break points“ für Staphylokokken wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit insgesamt 60 *Cp* Isolate hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen getestet. Wie in früheren Studien beschrieben waren alle untersuchten *Cp*-Isolate gegenüber den meisten getesteten Wirkstoffen „sensibel“ (Connor et al., 2000; Dorella et al., 2006) ausser gegen Penicillin, Oxacillin und Ampicillin. Für Penicillin lag bei 48 von 60 Isolaten der MHK Wert eine Stufe über dem für diese Studie festgelegten Grenzwert (0.25 mg/ml vs. 0.13 mg/ml). Diese 48 Isolate wurden daher als resistent eingestuft. Der Vergleich mit den Ergebnissen der Agardiffusion zeigte starke Divergenzen auf: nur 4 der in der MHK-Testung als resistent eingestuften *Cp*-Isolate wurden auch in der Agardiffusion als resistent bewertet. Für Oxacillin dagegen waren die Ergebnisse der MHK-Testung und der Agardiffusion etwas kongruenter mit 60 (MHK) vs. 51 (Agardiffusion) resistenten Isolate. Betrachtet man die Resultate der Hemmhofdurchmesser für Oxacillin genauer, so liegen von 8 Isolaten, die in der MHK-Testung als resistent beurteilt worden, die Werte genau 1 mm über dem Grenzwert und die Divergenz der Ergebnisse könnte auf eine Messungenauigkeit zurückzuführen sein. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Resultaten anderer Studien ist aufgrund der Unterschiede hinsichtlich der verwendeten Methoden und der unterschiedlichen getesteten Wirkstoffe nicht möglich.

Hinsichtlich der therapeutischen Beurteilung der Ergebnisse kann man sagen, dass *Cp in vitro* gegen eine Vielzahl von Antibiotika empfindlich ist, die antibiotische Behandlung der Pseudotuberkulose im kleinen Wiederkäuer ist dagegen sehr schwierig. Die *in vitro* Empfindlichkeitstestung kann also in der Regel nur Hinweise für den Ausschluss von bestimmten Wirkstoffen geben. Die tatsächliche *in vivo* Situation hängt von vielen tierart- und infektionsspezifischen Faktoren ab. Bei der Pseudotuberkulose spielen sicher die intrazelluläre Lebensweise von *Cp*, die Dicke der Abszesswand und die Möglichkeit der Biofilmbildung eine wichtige Rolle (Senturk and Temizel, 2006; Olsen et al., 2002). Laut Olsen et al. (2002) können Bakterien in Biofilmen sehr viel resistenter gegenüber antibiotischer Therapie sein. Olsen et al. (2002) haben einen Test entwickelt um *Cp* als Biofilm auf Antibiotikaresistenz zu testen. Dafür wurde der Begriff der „minimum biofilm eradication concentration“ (MBEC) definiert und mit MHK-Werten verglichen. Für *Cp* kamen dabei Werte heraus, die bis zu einem Faktor 1000 variieren. So zeigte sich zum Beispiel für Penicillin G, Cloxacillin, Ampicillin und Oxytetracyclin einen MHK von < 2 mg/l und einen MBEC von > 1024 mg/l. In der Literatur findet man Therapievorschläge, die eine chirurgische Therapie (Exzision oder Drainage) mit einer parenteralen antibiotischen Langzeittherapie von 4-6 Wochen kombinieren. Dies setzt voraus, dass neben den behandelten oberflächlichen Abszessen keine tiefen Lymphknoten betroffen sind (Baird and Fontaine, 2007). Senturk und Temizel (2006) konnten mit einer Kombination von Rifampicin und Oxytetracyclin klinische

Besserung, also eine signifikante Verkleinerung der oberflächlichen zuvor vergrößerten Lymphknoten feststellen. Aber Rifampicin kann nicht therapeutisch eingesetzt werden, da es nicht für Nutztiere zugelassen ist. Hinsichtlich des zoonotischen Potentials von *Cp* spielt die Resistenzsituation für *Cp* eine wichtige Rolle, da die chirurgische Entfernung der Abszesse mit einer antibiotischen Therapie kombiniert wird (Baird and Fontaine, 2007; Hémond, 2009). Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur MHK-Bestimmung für *Cp* in enger Anlehnung an CLSI-Normen erarbeitet. Diese neue Methode hat sich als gut geeignet für einen Einsatz in der Routinediagnostik erwiesen. Sie ist schnell und einfach anwendbar und ermöglicht die Untersuchung einer grösseren Anzahl von *Cp*-Isolaten. Aufgrund der Ergebnisse aus der Untersuchung von 60 *Cp*-Isolaten aus der Schweiz kann die Resistenzlage für *Cp* als günstig beurteilt werden, da *Cp* in beiden *in vitro* Testsystemen gegen die meisten Antibiotika empfindlich war. Die Ursache für die diskrepanten Ergebnisse zwischen Mikrobouillondilution und Agardiffusion bezüglich der Empfindlichkeit gegen Penicillin muss in weiteren Studien abgeklärt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Anderson D. E., Rings D. M. and Kowalski J. (2004)**
"Infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* in five alpacas."
Journal of the American Veterinary Medical Association, 225, 1743-1747.
- Baird G. and Fontaine M. (2007)**
"Corynebacterium pseudotuberculosis and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis"
Journal of Comparative Pathology 137 (4): 179-210
- Barksdale L., Linder R., Sulea I. T. and Pollice M. (1981)**
"Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*."
Journal of Clinical Microbiology 13 (2): 335-343.
- Barry C. E., Lee R. E., Mdluli K., Sampson A. E., Schroeder B. G., Slayden R. A. and Yuan Y. (1998)**
"Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions."
Progress in Lipid Research 37: 143-179.
- Batey R. G. (1986)**
"Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats."
Australian Veterinary Journal 63, 269-272.
- Bayan N., Houssin C., Chami M. and Leblon G. (2003)**
"Mycocomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications."
Journal of Biotechnology 104(1-3): 55-67.
- Bernheimer A. W., Linder R. and Avigad L. S. (1980)**
"Stepwise degradation of membrane sphingomyelin by corynebacterial phospholipases."
Infection and Immunity 29(1): 123-131.
- Biberstein E. L., Knight H. D. and Jang S. (1971)**
"Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*."
The Veterinary Record 89(26): 691-2
- Binns S. H., Green L.E. and Bailey M. (2007)**
"Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera."
Veterinary Microbiology 123:169-179.
- Braga W. U., Chavera A. and Gonzalez A. (2006)**
"Corynebacterium pseudotuberculosis infection in highland alpacas (*Lama pacos*) in Peru."
Veterinary Record 159: 23-24.

- Braverman** Y., Chizov-Ginzburg A., Saran A. and Winkler M. (1999)
 "The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel."
Revue scientifique et technique **18**(3): 681 -90.
- Brown** C. C. and **Olander** H. J. (1987)
 "Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review."
Veterinary Bulletin 57: 1-12.
- Burrell** D. H. (1981)
 "Caseous lymphadenitis in goats."
Australian Veterinary Journal 57: 105-110.
- Carne** H. R. and **Onon**, E. O. (1978)
 "Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on the endothelial cells of blood vessels."
Nature 271: 246-248.
- Cerdeira** L. T., Schneider M. P., Pinto A. C., de Almeida S. S., dos Santos A. R., Barbosa E. G., Ali A., Aburjaile F. F., de Abreu V. A., Guimarães L. C., Soares Sde C., Dorella F. A., Rocha F. S., Bol E., Gomes de Sá P. H., Lopes T. S., Barbosa M. S., Carneiro A. R., Jucá Ramos R. T., Coimbra N. A., Lima A. R., Barh D., Jain N., Tiwari S., Raja R., Zambare V., Ghosh P., Trost E., Tauch A., Miyoshi A., Azevedo V. and Silva A. (2011)
 "Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain CIP 52.97, isolated from a horse in Kenya."
Journal of Bacteriology 193(24): 7025-6.
- Clarridge** J. E. and **Spiegel** C. A. (1995)
 "Corynebacterium and miscellaneous irregular gram-positive rods, Erysipelothrix, and Gardnerella."
Manual of clinical microbiology 6: 357-378.
- Collins** M. D., Goodfellow M. and Minnikin D. E. (1982)
 "Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria."
Journal of General Microbiology 128(11): 2503-09.
- Connor** K. M., Quirie M. M., Baird G. and Donachie W. (2000)
 "Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis."
Journal of Clinical Microbiology 38: 2633-37.
- Costa** L. R., Sharon R., Spiera J. and Hirsh D. C. (1998)
 "Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin."
Veterinary Microbiology 62 (2): 135-143.
- Craig** W. A. (1995)
 "Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broadspectrum cephalosporins"
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 22: 89–96.

- Craig** W. A. (1998)
 "Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men."
Clinical Infectious Diseases 26: 1–12.
- Dercksen** D. P., ter Laak E. A. and Schreuder B. E. C. (1996)
 "Eradication programme for caseous lymphadenitis in goats in the Netherlands."
The Veterinary Record 138 (10): 237.
- Dorella** F. A., Pacheco L. G., Oliveira S. C., Miyoshi A. and Azevedo V. (2006)
 "*Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence."
Veterinary Research 37(2): 201-218.
- Fernández** E. P., Vela A. I., Las Heras A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J. F. and Moreno M. A. (2001)
 "Antimicrobial susceptibility of corynebacteria isolated from ewe's mastitis."
International Journal of Antimicrobial Agents 18: 571– 574.
- Foley** J. E., Spier S. J., Mihalyi J., Niki Drazenovich N. and Leutenegger C. M. (2004)
 "Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses."
American Journal of Veterinary Research 65 (12): 1734-1737.
- Fraser** G. (1961)
 "Haemolytic activity of *Corynebacterium ovis*."
Nature 189: 246.
- Fuchs** F. (2009)
 "Empfindlichkeitsprüfung von tierpathogenen Bakterien gegen Antibiotika und Chemotherapeutika in vitro."
Diss. Vet med. Fakultät, Universität Zürich
- Gayen** K. and **Venkatesh** K. V. (2008)
 "Quantification of cell size distribution as applied to the growth of *Corynebacterium glutamicum*."
Microbiological Research 163 (5): 586-593.
- Goodfellow** M. (1989)
 "Suprageneric classification of actinomycetes"
Williams S.T. (Ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 2333–43.
- Hämmerli** M., Krähenbühl P., Rothenbühler D., Schefold S., Vögeli Y., Zimmermann L. und Giacometti M. (1999)
 "Schafe auf der Alp: Verkannte Landschaftspfleger?"
 Interdisziplinäre Projektarbeit in Allgemeiner Ökologie, Interfakultäre Koordinationsstelle für allgemeine Ökologie der Universität Bern, Bern, Switzerland.
- Hein** W. R. and Cargill C. F. (1981)
 "An abattoir survey of diseases of feral goats."
Australian Veterinary Journal 57: 498-503.

- Hémond V.**, Rosenstingl S., Auriault M. L., Galanti M. J. and M. Gatfosse M. (2009)
 "Lymphadénite axillaire à *Corynebacterium pseudotuberculosis* chez une patiente de 63 ans."
Médecine et Maladies Infectieuses 39 (2): 136-139.
- Hodgson A. L.**, Carter K., Tachedjian M., Krywult J., Corner L. A., McColl M. and Cameron A. (1999)
 "Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D"
Vaccine 17: 802–808.
- Ionedá T.** (1993)
 "Chromatographic and mass spectrometric characterization of 3-O-benzoyl methyl ester derivatives of mycolic acid fractions from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae* and *Rhodococcus rhodochrous*."
Chemistry and Physics of Lipids 65 (2): 93-101
- Judson R.** and **Songer J. G.** (1991)
 "*Corynebacterium pseudotuberculosis*: in vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents."
Veterinary Microbiology 27: (2): 145-150.
- Kaba J.**, Kutschke L. and Gerlach G. F. (2001)
 "Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats."
Veterinary Microbiology 78: 155-163.
- Kietzmann M.**, Böttner A., Hafez H. M., Kehrenberg C., Klarmann D., Krabisch P., Kühn T., Luhofer G., Richter A., Schwarz S., Traeder W., Waldmann K. H., Wallmann J. and Werckenthin C. (2004)
 "Antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from animals: considerations concerning the predefinition of breakpoints from the clinical pharmacological viewpoint"
Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift 117(3-4): 81-7.
- Lloyd S.** (1994)
 "Caseous lymphadenitis in sheep and goats."
In Practice 16 (1): 24-29.
- Lopes T.**, Silva A., Thiago R., Carneiro A., Dorella F. A., Rocha F. S., Dos Santos A. R., Lima A. R., Guimarães L. C., Barbosa E. G., Ribeiro D., Fiaux K. K., Diniz C. A., de Abreu V. A., de Almeida S. S., Hassan S. S., Ali A., Bakhtiar S. M., Aburjaile F. F., Pinto A. C., Soares Sde C., Pereira Ude P., Schneider M. P., Miyoshi A., Edman J., Spier S. and Azevedo V. (2012)
 "Complete Genome Sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strain Cp267, Isolated from a Llama."
Journal of Bacteriology 194(13): 3567-8.
- Marienfeld S.**, Uhlemann E. M., Schmid R., Krämer R. and Burkovski A. (1997)
 "Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall."
Antonie Van Leeuwenhoek 72(4): 291-7.

- McNamara P. J., Cuevas, W. A. and Songer, J. G. (1995)**
 "Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology"
Gene 156: 113-118.
- Menzies P. I., Hwang Y.T. and Prescott J. F. (2004)**
 "Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats."
Veterinary Microbiology 100: 129-137.
- Mills A. E., Mitchell R. D. and Lim E. K. (1997)**
 "*Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis."
Pathology 29: 231-233.
- Moura-Costa L. F., Bahia R. C., Carminati R., Vale V. L., Paule B. J., Portela R. W., Freire S. M., Nascimento I., Schaer R., Barreto L. M., Meyer R. (2008)**
 "Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis."
Veterinary Immunology and Immunopathology 126(1-2): 131-41.
- Muckle C. A. and Gyles, C. L. (1982)**
 "Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*."
Canadian journal of comparative medicine 46 (2): 2.
- Olson M. E., Ceri H., Morck D. W., Buret A. G., Read R. R. (2002),**
 "Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics."
Canadian Journal of Veterinary Research 66: 86–92.
- Peel M. M., Palmer G. G., Stacpoole A. M. and Kerr T. G. (1997)**
 "Human Lymphadenitis Due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of Ten Cases from Australia and Review."
Clinical Infectious Diseases 24 (2): 185-191.
- Pethick F. E., Lainson A. F., Yaga R., Flockhart A., Smith D. G., Donachie W., Cerdeira L. T., Silva A., Bol E., Lopes T. S., Barbosa M. S., Pinto A. C., Dos Santos A. R., Soares S. C., Almeida S. S., Guimaraes L. C., Aburjaile F. F., Abreu V. A., Ribeiro D., Fiaux K. K., Diniz C. A., Barbosa E. G., Pereira U. P., Hassan S. S., Ali A., Bakhtiar S. M., Dorella F. A., Carneiro A. R., Ramos R. T., Rocha F. S., Schneider M. P., Miyoshi A., Azevedo V. and Fontaine M. C. (2012)**
 "Complete Genome Sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strain 1/06-A, Isolated from a Horse in North America."
Journal of Bacteriology 194(16): 4476.
- Pépin M., Boisramé A. and Marly J. (1989)**
 "*Corynebacterium pseudotuberculosis*: biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains."
Annales de recherches vétérinaires 20 (1): 4.

- Piontkowski M. D. and Shivers D. W. (1998)**
 "Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep."
Journal of the American Veterinary Medical Association 212(11): 1765-8.
- Quinn P., Carter M. E., Markey B. and Carter G. R. (1999)**
 "Corynebacterium species and *Rhodococcus equi*,"
Clinical veterinary microbiology 137-143. Mosby, Edinburgh, Scotland
- Rebouças M. F., Portela R. W., Lima D. D., Loureiro D., Bastos B. L., Moura-Costa L. F., Vale V. L., Miyoshi A., Azevedo V. and Meyer R. (2011)**
 "Corynebacterium pseudotuberculosis secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats."
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 23(2): 213-20.
- Renshaw H. W., Gra V. P. and Gates N. L. (1979)**
 "Visceral caseous lymphadenitis in thin ewe syndrome: isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, and *Moraxella* spp. from internal abscesses in emaciated ewes."
American Journal of Veterinary Research 40: 1110-1114.
- Ruiz J. C., D'Afonseca V., Silva A., Ali A., Pinto A. C., Santos A. R., Rocha A. A., Lopes D. O., Dorella F. A., Pacheco L. G., Costa M. P., Turk M. Z., Seyffert N., Moraes P. M., Soares S. C., Almeida S. S., Castro T. L., Abreu V. A., Trost E., Baumbach J., Tauch A., Schneider M. P., McCulloch J., Cerdeira L. T., Ramos R. T., Zerlotini A., Dominittini A., Resende D. M., Coser E. M., Oliveira L. M., Pedrosa A. L., Vieira C. U., Guimarães C. T., Bartholomeu D. C., Oliveira D. M., Santos F. R., Rabelo É. M., Lobo F. P., Franco G. R., Costa A. F., Castro I. M., Dias S. R., Ferro J. A., Ortega J. M., Paiva L. V., Goulart L. R., Almeida J. F., Ferro M. I., Carneiro N. P., Falcão P. R., Grynberg P., Teixeira S. M., Brommonschenkel S., Oliveira S. C., Meyer R., Moore R. J., Miyoshi A., Oliveira G. C. and Azevedo V. (2011)**
 "Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains."
PLoS One 6(4): e18551
- Ryser-Degiorgis M.-P., Ingold P., Tenhu H., Tébar Less A. M., Ryser A. and Giacometti M. (2002)**
 "Encounters between alpine ibex, alpine chamois and domestic sheep in the Swiss alps."
Hystrix - Italian Journal of Mammalogy 13 (1-2): 1-11.
- Schwarz S., Böttner A., Hafez H. M., Kehrenberg C., Kietzmann M., Klarmann D., Klein G., Krabich P., Kühn T., Luhofer G., Richter A., Traeder W., Waldmann K.H., Wallmann J. and Werckenthin C. (2003)**
 "Antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from animals: methods for in-vitro susceptibility testing and their suitability with regard to the generation of the most useful data for therapeutic applications"
Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift 116(9-10):353-61.
- Senturk S. and Temizel M. (2006)**
 "Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracyclin in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. "
The Veterinary Record 159: 216-217.

- Seyffert N.**, Guimarães A. S., Pacheco L. G., Portela R. W., Bastos B. L., Dorella F. A., Heinemann M. B., Lage A. P., Gouveia A. M., Meyer R., Miyoshi A. and Azevedo V. (2010)
 "High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA."
Res Vet Sci. 88(1): 50-5.
- Songer J. G.**, Beckenbach K., Marshall M. M., Olson G. B. and Kelley L. (1988)
 "Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*"
American Journal of Veterinary 49 (1988) 223–26.
- Songer J. G.** (1997)
 "Bacterial phospholipases and their role in virulence."
Trends in Microbiology 5 (4): 156-161.
- Stapleton S.**, Bradshaw B. and O'Kennedy R. (2009)
 "Development of a surface plasmon resonance-based assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep."
Analytica Chimica Acta 651(1): 98-104.
- Sutherland S. S.**, Hart R. A. and Buller N. B. (1996)
 "Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms"
Veterinary Microbiology 49: 1–9.
- Tarello W.** and **Theneyan M.** (2008)
 "*Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Corynebacterium renale* isolated from two Arabian oryx (*Oryx leucoryx*)."
Veterinary Record 162 (26): 862-3.
- Tashjian J. J.** and **Campbell S. G.** (1983)
 "Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopic study."
American Journal of Veterinary Research 44: 690-693.
- Ter Laak E. A.**, Bosch J., Bijl G. C. and Schreuder B. E. (1992)
 "Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep."
American Journal of Veterinary Research 53 (7): 1125-32.
- Trost E.**, Ott L., Schneider J., Schröder J., Jaenicke S., Goesmann A., Husemann P., Stoye J., Dorella F. A., Rocha F. S., Soares Sde C., D'Afonseca V., Miyoshi A., Ruiz J., Silva A., Azevedo V., Burkovski A., Guiso N., Join-Lambert O. F., Kayal S. and Tauch A. (2010)
 "The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence."
BMC Genomics 11: 728.
- Wallmann J.**, Schröter K., Wieler L. H. and Kroker R. (2003)
 National antibiotic resistance monitoring in veterinary pathogens from sick food-producing animals: the German programme and results from the 2001 pilot study.
International Journal of Antimicrobial Agents 22(4): 420-8.

- Wallmann J.**, Kaspar H. and Kroker R. (2004)
"The prevalence of antimicrobial susceptibility of veterinary pathogens isolated from cattle and pigs: national antibiotic resistance monitoring 2002/2003 of the BVL"
Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift 117: 480-92.
- Washburn K. E.**, Bissett W. T., Fajt V. R., Libal M. C., Fosgate G. T., Miga J. A. and Rockey K.M. (2009)
"Comparison of three treatment regimens for sheep and goats with caseous lymphadenitis."
Journal of the American Veterinary Medical Association 234(9): 1162-6.
- Weiss K.**, Laverdiere M. and Rivest R. (1996)
"Comparison of antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species by broth microdilution and disk diffusion methods."
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40(4): 930-933.
- Williamson L. H.** (2001)
"Caseous lymphadenitis in small ruminants."
The Veterinary clinics of North America. Food animal practice 17(2): 359-71.

7 Sonstige Literatur-Quellen

BGK-Technische Weisung

Technische Weisung Pseudotuberkulose-Überwachungsprogramm der Ziegen, Beratungs- und Gesundheitsdienst für Kleinwiederkäuer

BGK - Pseudotuberkulose-Sanierungsprogramm für Ziegen

Technische Weisung - Pseudotuberkulose-Sanierungsprogramm für Ziegen, Beratungs- und Gesundheitsdienst für Kleinwiederkäuer

BVET 2008 Bundesamt für Veterinärwesen. Infoblatt zur Tierseuche: Pseudotuberkulose der Schafe und Ziegen.

CLSI 2006 a Approved standards M2-A9 Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI 2006 b Approved standards M7-A7 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that grow aerobically. Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI 2008 Approved standards M31-A3 Performance standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Clinical and Laboratory Standards Institute.

EMA European Medicines Agency
Veterinary Medicines - Maximum Residue Limits (MRL)

TAMV 12.1 Tierarzneimittel Verordnung
Anhang 4: Verbotene Wirkstoffe

Curriculum Vitae

Name Vorname	Schulthess Stephanie
Geburtsdatum	16. August 1984
Geburtsort	Baden-Dättwil, Aargau
Nationalität	Schweizerin
Heimatort	Killwangen, Aargau

08/92 - 06/96	Primarschule, Baden-Dättwil und Killwangen
08/96 - 06/00	Bezirksschule, Spreitenbach
08/00 - 06/01	Diplommittelschule, Wettingen
08/01 - 06/05	Gymnasium Wettingen
25/07/2005	Matura (zweisprachig), Gymnasium Wettingen
09/05 - 09/11	Veterinär Medizin, Vetsuisse Fakultät Zürich
17/10/2011	Diplom Tierärztin, Universität Zürich
10/08 - 05/11	Anfertigung der Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Ludwig E. Hölzle am Institut für Veterinärbakteriologie der Vetsuisse Fakultät Zürich, Direktor Prof. Dr. med. vet. Max M. Wittenbrink
12/11 - 03/12	Assistentztierärztin, Pferdeklunik Kerken, Wachtendonk, Deutschland
04/12 - 06/12	Assistentztierärztin, Fahrpraxis für Pferde Dr. A. Feichtenschlager, Willich, Deutschland
08/12 -	Assistentztierärztin, Tierklinik Partners, Wehr, Deutschland